Aus der Abteilung Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. W. Dölle
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Uridin-diphospho-glucuronyltransferase der menschlichen Leber (E.C.2.4.1.17) – Einfluß von Arzneimitteln und Lebererkrankungen –

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Uwe Dieter Stärz
aus Nordhorn

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546518_0010

Aus der Abteilung Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. W. Dölle
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Uridin-diphospho-glucuronyltransferase der menschlichen Leber (E.C.2.4.1.17) – Einfluß von Arzneimitteln und Lebererkrankungen –

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Uwe Dieter Stärz
aus Nordhorn

1984

Dekan: Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. R. Fleischmann
2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. H. Remmer

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

0	Inhaltsverzeichnis	
1.	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Vorbemerkungen	1
1.2	Reaktionen der UDP-Glucuronyltransferasen	4
1.2.1	In-vitro-Aktivierung der UDP-Glucuronyltransferase	7
1.2.2	Die Heterogenität der UDP-Glucuronyltransferasen	10
1.2.3	Unterschiede in der Aktivität der UDP-Glucuronyltransferasen	13
1.2.3.1	In-vivo-Induktion der UDP-Glucuronyltransferasen	13
1.2.3.2	Andere Einflüsse auf die UDP-Glucuronyltransferasen	14
1.3	Ziel der vorliegenden Untersuchung	17
2.	Material und Methoden	18
2.1	Materialien	18
2.2	Geräte	19
2.3	Methoden	20
2.3.1	Gewinnung von Mikrosomen	20
2.3.1.1	Gewinnung des Probenmaterials von Ratten	20
2.3.1.2	Gewinnung des menschlichen Probenmaterials	21

2.3.2	Mikrosomenpräparation	21
2.3.2.1	Stammlösungen	22
2.3.2.2	Makromethode der Mikrosomenpräparation	22
2.3.2.3	Mikromethode der Mikrosomenpräparation	23
2.3.3	Gefriertrocknung der Mikrosomen	25
2.3.4	Lagerung der Mikrosomen	25
2.3.5	Lösen der Mikrosomen	25
2.3.6	Stabilität der Mikrosomen bei Lagerung als Lyophilisat	26
2.3.7	Die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase	26
2.3.7.1	Prinzip der Meßmethode	26
2.3.7.2	Stammlösungen	27
2.3.7.3	Reagentienmischung	27
2.3.7.4	Ausführung der Enzymbestimmung	28
2.3.7.5	Berechnung der Enzymaktivität	29
2.3.8	Die Morphin-UDP-Glucuronyltransferase	31
2.3.8.1	Prinzip der Meßmethode	31
2.3.8.2	Stammlösungen	31
2.3.8.3	Reagentienmischungen	32
2.3.8.4	Ausführung der Enzymbestimmung	33
2.3.8.5	Berechnung der Enzymaktivität	34
2.3.9	Messungen der Radioaktivität	36
2.3.10	Die Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase	36
2.3.10.1	Prinzip der Meßmethode	36

2.3.10.2	Stammlösungen	37
2.3.10.3	Reagentienmischungen	38
2.3.10.4	Ausführung der Enzymbestimmung	38
2.3.10.5	Berechnung der Enzymaktivität	40
2.3.11.	Die p-Nitrophenol-UDP-Glucuronyl-transferase	41
2.3.11.1	Prinzip der Meßmethode	41
2.3.11.2	Stammlösungen	42
2.3.11.3	Reagentienmischungen	42
2.3.11.4	Ausführung der Enzymbestimmung	43
2.3.12	Bestimmung der Proteinkonzentration	43
2.3.12.1	Stammlösungen	44
2.3.12.2	Ausführung der Proteinbestimmung	44
2.3.13	Präzision und Reproduzierbarkeit der Enzymmessungen	47
3.	Ergebnisse	48
3.1	Enzymkinetische Untersuchungen	48
3.1.1	Untersuchungen zu der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase	48
3.1.1.1	Zeitabhängigkeit der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase	48
3.1.1.2	Proteinabhängigkeit der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase	50
3.1.1.3	Abhängigkeit der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase von der UDPGA-Konzentration	53

3.1.1.4	Abhängigkeit der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase von der 1-Naphthol-Konzentration	54
3.1.1.5	Die Abhängigkeit der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase von der Mg^{++}-Konzentration	54
3.1.1.6	Abhängigkeit der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase von der Brij 58 Konzentration	57
3.1.2	Untersuchungen zu der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase	61
3.1.2.1	Zeitabhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase	61
3.1.2.2	Proteinabhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase	67
3.1.2.3	Abhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase von der UDPGA-Konzentration	67
3.1.2.4	Abhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase von der Morphin-Konzentration	68
3.1.2.5	Abhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase von der Mg^{++}-Konzentration	68
3.1.2.6	Abhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase von der Brij 58 Konzentration	68

3.1.3	Untersuchungen zu der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase	72
3.1.3.1	Zeitabhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase	72
3.1.3.2	Proteinabhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase	76
3.1.3.3	Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase von der UDPGA-Konzentration	76
3.1.3.4	Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase von der Bilirubin-Konzentration	76
3.1.3.5	Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase von der Mg^{++}-Konzentration	79
3.1.3.6	Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase von der Brij 58-Konzentration	79
3.1.3.7	Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase (vollaktivierte Form) von der UDPNAcG-Konzentration	83
3.1.4	Untersuchungen zur p-Nitrophenol-UDP-Glucuronyltransferase	83
3.1.4.1	Proteinabhängigkeit der p-Nitrophenol-UDP-Glucuronyltransferase	84
3.1.4.2	Zeitabhängigkeit der p-Nitrophenol-UDP-Glucuronyltransferase	84

3.2	Empfindlichkeiten der Methoden	84
3.2.1	Empfindlichkeit der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase	84
3.2.2	Empfindlichkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase	91
3.2.3	Empfindlichkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase	92
3.3	Tierversuche	92
3.3.1	Einleitung	92
3.3.2	Versuchsdurchführung und Gruppeneinteilung	92
3.3.3	Ergebnisse der Tierversuche	96
3.4	Ergebnisse der Untersuchungen an menschlichen Lebermikrosomen	97
3.4.1	Einleitung	97
3.4.2	Aktivitätsunterschiede zwischen bioptischem und Exzisionsmaterial	97
3.4.3	Korrelation zwischen den einzelnen Formen der UDP-Glucuronyltransferase	98
3.4.4	Altersabhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferasen	99
3.4.5	Geschlechtsabhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferasen	99
3.4.6	Abhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferasen von den Rauchgewohnheiten	100
3.4.7	Einteilung der Patienten in Diagnosegruppen	102
3.4.7.1	Patienten mit normaler Leberhistologie	103

3.4.7.1.1	Die Normalgruppe	103
3.4.7.1.2	Patienten mit Karzinomen im Gastrointestinaltrakt	104
3.4.7.1.3	Patienten mit Cholelithiasis und ohne Leberveränderungen	104
3.4.7.2	Patienten mit pathologischen Leberveränderungen	104
3.4.7.2.1	Patienten mit geringgradiger Leberepithelverfettung	105
3.4.7.2.2	Patienten mit mittelschwerer Leberepithelverfettung	108
3.4.7.2.3	Patienten mit schwerer Leberepithelverfettung	108
3.4.7.2.4	Patienten mit geringer mesenchymaler Reaktion des Lebergewebes	108
3.4.7.2.5	Patienten mit chronischen Hepatitiden	109
3.4.7.2.6	Patienten mit nicht-alkoholischen Leberzirrhosen	109
3.4.7.2.7	Patienten mit granulomatösen Infiltraten in der Leber	109
3.4.7.2.8	Patienten mit chronisch rezidivierenden Pericholangitiden	110
3.4.7.2.9	Patienten mit chronisch rezidivierender Pericholangitis und gleichzeitiger Leberzellverfettung	110
3.4.7.2.10	Patienten mit einer Infiltration eines systemischen malignen Prozesses	110
3.4.7.2.11	Patienten mit verschiedenen anderen Befunden	113

3.4.7.3	Einfluß von exogenen Faktoren auf die Enzymaktivität der UDP-Glucuronyltransferasen	113
3.4.7.3.1	Induktionseffekte des Rifampicin	114
3.4.7.3.1.1	Rifampicin-Patienten mit normaler Leberhistologie	114
3.4.7.3.1.2	Rifampicin-Patienten mit Veränderungen der Leberhistologie	115
3.4.7.3.2	Effekte des Polyoestradiol	115
3.4.7.3.3	Effekte des Spironolacton	116
3.4.7.3.4	Effekte einer Corticoid-Therapie	120
3.4.7.3.5	Oestrogen-haltige Antikonzeptiva	120
3.4.7.3.6	Einzelfälle	121
3.4.7.4	Einfluß des Alkoholabusus auf die Aktivität der UDP-Glucuronyltransferasen	121
3.4.7.4.1	Alkoholische Leberzirrhose	122
3.4.7.4.2	Alkoholische Fettleber	122
4.	Wertung und Interpretation	123
4.1	Die UDP-Glucuronyltransferasen im Zusammenhang anderer Enzyme	123
4.2	Die kinetischen Daten der UDP-Glucuronyltransferasen	126
4.3	Tierversuche	129
4.4	Menschliche Mikrosomen	134

4.4.1	Vergleich der Aktivität menschlicher und Rattenmikrosomen	134
4.4.2	Die Heterogenität der UDP-Glucuronyltransferasen in menschlichen Mikrosomen	136
4.4.3	Altersabhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferasen	137
4.4.4	Geschlechtsabhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferasen	137
4.4.5	Die UDP-Glucuronyltransferase bei Patienten mit normaler Leberhistologie	138
4.4.5.1	Die Normalgruppe	139
4.4.5.2	Patienten mit Karzinomen der oberen Gastrointestinaltraktes	140
4.4.5.3	Patienten mit Cholelithiasis	140
4.4.6	Die UDP-Glucuronyltransferasen bei Patienten mit Leberepithelverfettung	144
4.4.6.1	Patienten mit geringgradiger Leberepithelverfettung	145
4.4.6.2	Patienten mit mittelgradiger Leberparenchymverfettung	147
4.4.6.2	Patienten mit schwerer Leberparenchymverfettung	147
4.4.7	Patienten mit geringen unspezifischen Reaktionen der Leber	148
4.4.8	Patienten mit chronischen Hepatitiden	149
4.4.9	Patienten mit nicht-alkoholischer Leberzirrhose	151

4.4.10	Patienten mit granulomatösen Entzündungen der Leber	152
4.4.11	Patienten mit chronisch rezidivierender Pericholangitis	153
4.4.11.1	Patienten mit chronisch rezidivierender Pericholangitis	154
4.4.11.2	Patienten mit chronisch rezidivierender Pericholangitis und Leberparenchymverfettung	155
4.4.12	Infiltration eines systemischen Prozesses	155
4.4.13	Anmerkungen	155
4.4.14	Nicht klassierte Ergebnisse	156
4.4.15	Einfluß von Medikamenten und Alkohol auf die Aktivität der UDP-Glucuronyltransferasen	156
4.4.15.1	Rifampicin-Patienten mit normaler Leberhistologie	157
4.4.15.2	Rifampicin-Patienten mit Veränderungen der Leberhistologie	160
4.4.15.3	Vergleich beider Rifampicin-Gruppen	160
4.4.15.4	Effekte des Polyoestradiol	161
4.4.15.5	Effekte einer Spironolacton-Therapie	164
4.4.15.6	Effekte einer Corticoid-Therapie	164
4.4.15.7	Oestrogen-haltige Antikonzeptiva	165

4.4.15.8	Einfluß des Alkoholabusus auf die Aktivität der UDP-Glucuronyltransferasen	165
4.4.15.8.1	Alkoholische Leberzirrhose	166
4.4.15.8.2	Alkoholische Fettleber	166
4.4.15.8.3	Anmerkung	167
5.	Zusammenfassung	168
6.	Literaturverzeichnis	174

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Vorbemerkungen

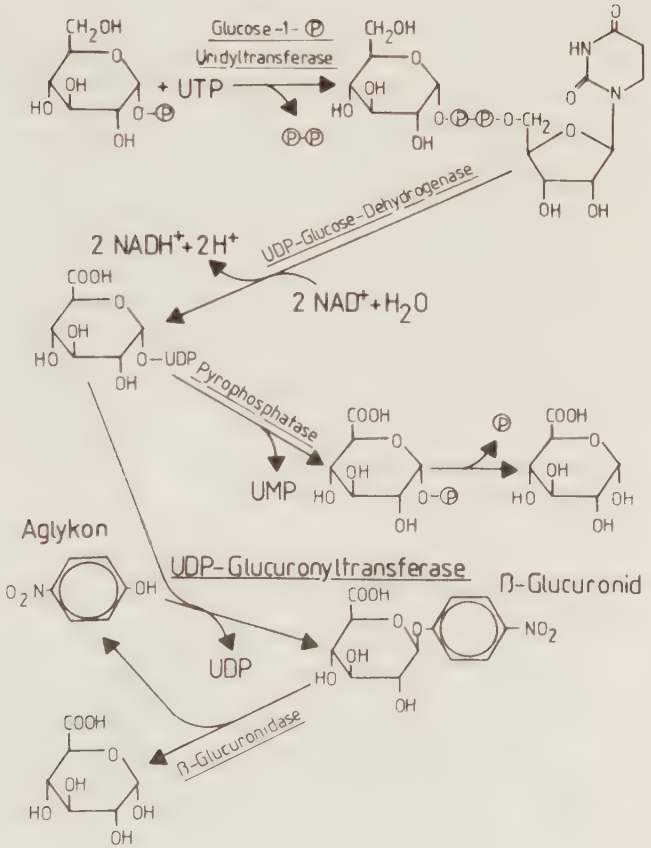
Jeder lebende Organismus muß sich mit seiner Umwelt auseinandersetzen. Dazu muß ihm die Möglichkeit gegeben sein, Arbeit zu leisten und sich zu reproduzieren, um seine Art zu erhalten. Beide Bedingungen zusammen gewährleisten die Existenz lebender Systeme und sind erst dann erfüllt, wenn dieser Organismus ein offenes System darstellt, denn nur dann können sich Fließgleichgewichte aufbauen, die sowohl zur Energiegewinnung als auch zum Aufbau körperlicher Substanz nötig sind. Dieser sogenannte Zustand des steady state beinhaltet, daß andauernd Substanzen einströmen und Produkte aus dem System herausgeschleust werden. Damit gehören zum Wesen der Offenheit Transportvorgänge an der Peripherie des Organismus. Diese Transportvorgänge können nicht vollkommen selektiv sein, so daß neben Substanzen, die zur Ernährung oder dem Aufbau körpereigenen Materials dienen, auch Stoffe resorbiert werden, die der Körper nicht verwerten kann, die für ihn giftig sein können, zu diesen Fremdstoffen zählen im tierischen Organismus neben den Giften auch die Arzneimittel. Natürlich fallen auch im Organismus Stoffe an, meist Abbauprodukte, die eliminiert werden müssen, weil sie in höheren Dosen toxische Wirkungen ausüben. Beide Klassen werden zum Teil über dieselben metabolischen Wege ausgeschieden.
Viele zur Ausscheidung bestimmte Stoffe besitzen

UNIV. LEIDEN

eine starke Lipophilie, was einer direkten Exkretion über die Nieren und teilweise auch über die Gallenwege entgegensteht, Voraussetzung dafür ist die Hydrophilie der Substanzen (11,47). Deshalb müssen die Moleküle in hydrophile Metabolite umgewandelt werden. Die wichtigsten dazu bestimmten Enzymsysteme sind in der Lipidmembran des glatten endoplasmatischen Retikulum und der Kernhülle (16) gebunden. In dieser Organelle werden sowohl körpereigene als auch Fremdstoffe umgesetzt. (11,47,91,96)

Abbildung 1

Aufbau und Reaktion der aktivierten Glucuronsäure (UDPGA)



Man kann alle beteiligten Reaktionen in zwei Gruppen unterteilen :

Phase I : strukturverändernde Reaktionen

Phase II : aufbauende (konjugierende) Reaktionen

Ad Phase I) In diesen Umwandlungen, die meist den ersten Schritt bedeuten, wird die Struktur der einzelnen Moleküle verändert. Durch Monooxygenasen werden einzelne Sauerstoffatome eingeführt, daraus resultieren dann je nach Ausgangsverbindung Hydroxyl-, Amino-, Carbonyl- oder Hydroxylaminogruppen. Neben Oxygenasen sind an den Reaktionen von Fremdstoffen auch Oxydasen beteiligt (Alkoholdehydrogenasen, Monaminooxydasen). Auch Reduktionen und Hydrolysen werden vorgenommen. Zusammenfassend kann man sagen, daß die Reaktionen der Phase I in einer Bereitstellung von kopplungsfähigen Gruppen bestehen (-OH, -COOH, $-NH_2$, -SH).

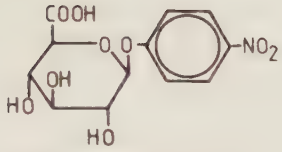
Ad Phase II) Diese funktionellen Gruppen können in den Reaktionen der Phase II mit hydrophilen Gruppen konjugiert werden. Am wichtigsten scheinen die membrangebundenen UDP-Glucuronyltransferasen zu sein, daneben existieren noch UDP-Glucosyltransferasen, UDP-Xylosyltransferasen, Sulfotransferasen, Glutathion-S-Transferasen, Methyltransferasen und die Synthesen von Amiden.

1.2 Reaktionen der UDP-Glucuronyltransferasen (Abb. 1.2)

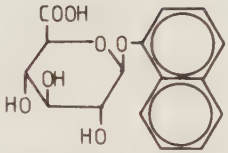
Das wichtigste Kopplungsprodukt der Reaktionen der Phase II sind ß-Glucuronide, deren Bildung durch membrangebun-

Abbildung 2

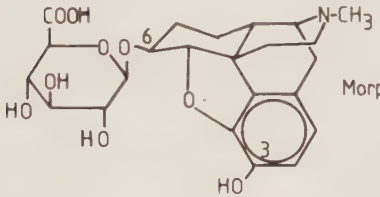
β-Glucuronide



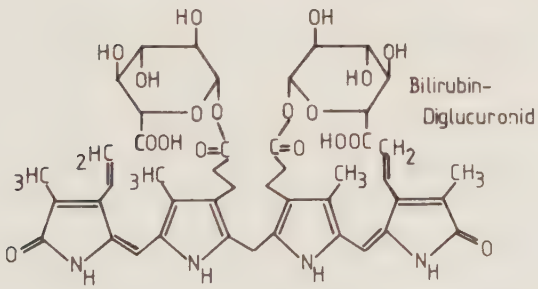
p-Nitrophenol-Glucuronid



1-Naphthol-Glucuronid



Morphin-6-Glucuronid



Bilirubin-
Diglucuronid

denen Uridin-diphospho-glucuronyltransferasen (UDP-Glucuronyltransferasen) katalysiert wird, indem sie aktivierte Glucuronsäure, Uridin-diphospho-glucuronsäure (UDPGA), unter Abspaltung des Diphosphouridins auf verschiedene funktionelle Gruppen übertragen (Abbildung 1). Kopplungsfähige Gruppen für die Glucuronsäure sind Hydroxyl- (Äthertyp), Carboxyl- (Estertyp), Amino- (N-Glucuronide) und Thio-Gruppen (Thioäthertyp) des Aglykons (in Klammern die entstehende Verbindung) (8, 12, 63).
Die aktivierte Glucuronsäure wird in der Leber aus Glucosephosphat hergestellt, normalerweise in ausreichendem Maße (36). Neben der Leber, der Hauptlokalisation, finden sich Glucuronyltransferasen in geringem Maße auch in anderen Organen, besonders in den Nieren (82, 107, 110, 142), im Intestinum (7, 62, 86, 120, 142), in der Haut (3, 4) und in der Lunge (3, 107).
Neben wichtigen Abbauprodukten wie zum Beispiel dem Bilirubin (1, 69, 84, 119, 133, 147, 166, 173, 184), den Steroidhormonen (77, 79, 138, 192), den Gallensäuren (13, 56, 75, 76, 117, 162, 74) und den Schilddrüsenhormonen stellen auch viele exogene Substanzen Substrate für die UDP-Glucuronyltransferasen dar. Dazu zählen Arzneimittel, Insektizide (deren Metabolite), aber auch Kanzerogene (16, 37, 38). Unter den Pharmaka sind besonders zu erwähnen Oxazepam (83, 178), Morphin (32, 154, 155, 172, 186), Chloramphenicol (26, 35, 40, 103, 163, 186) und Phenolphthalein (102, 126, 186). Eine zweite Gruppe wichtiger Substanzen, zumindest was In-vit-

ro-Untersuchungen betrifft, sind die Phenole, die natürlich auch von der Darmflora erzeugt werden, folgende Beispiele sollten genannt werden: p-Nitrophenol (109, 125, 131, 167, 195), o-Aminophenol (148, 186, 190) und Naphthol (31, 32, 43, 37).

1.2.1 In-vitro-Aktivierung der UDP-Glucuronyltransferase

Die UDP-Glucuronyltransferasen liegen in nativen Mikrosomen und Kernhüllen (16) nicht in vollaktivierter Form vor, sondern zeigen einen Zustand, den man als Latenz oder Constraintment bezeichnet. Diese Eigenschaft läßt sich an Hand zweier Modelle erklären, deren Existenz noch vollkommen hypothetisch ist. Das Konformationsmodell (192, 193) meint, daß die intakte Phospholipidumgebung die Aktivität der membrangebundenen UDP-Glucuronyltransferasen durch Wechselwirkung vermindert und deren Konformation stabilisiert. Nur in diesem nativen Zustand wirkt Uridindiphospho-N-Acetylglucosamin (UDPNAcG) als spezifischer allosterischer Aktivator, während die Hemmwirkung von Diphosphouridin (UDP), Triphosphouridin (UTP) und Uridinphosphoglucose (UDP-Glucose) gering ist. Da das aktive Zentrum des Enzyms in die Lipidmembran eingebettet sein soll, müssen alle Substrate diese Permeationsbarriere überwinden. Zerstört man dieses Diffusionshindernis, liegt das aktive Zentrum frei und kann durch alle Substrate leicht erreicht werden, was sich in einer Aktivierung bemerkbar macht. Die allosterische Beeinflussung durch UDP-NAcG entfällt, aber man kann eine erhöhte Hemmpo-

tenz von UDP, UTP und UDP-Glucose nachweisen. Das Kompartimentierungsmodell (23, 24, 55, 187) fordert dagegen, daß im intakten Organismus und in nativen Microsomen das aktive Zentrum der UDP-Glucuronyltransferasen dem intrazisternalen Raum des glatten endoplasmatischen Retikulums zugewandt ist, der für das polare UDPGA nicht frei erreichbar ist. Das Cosubstrat UDPGA wird durch eine spezifische Permease hereingeschleust, die durch Mg^{++}-Ionen und UDPNAcG stimuliert wird. Daneben aktivieren die Mg^{++}-Ionen noch eine ebenfalls im intrazisternalen Raum den UDP-Abbau katalysierende Nukleosid-Diphosphatase. Wird nun die Integrität der Membran zerstört, liegt das Enzym frei und kann von UDPGA ohne Permeationshindernis erreicht werden.

Die Membran kann durch verschiedene Vorgehensweisen verändert werden, was zu einer Aktivierung des Enzyms führen kann. Allein schon die Lagerung der Microsomen, die bei verschiedenen Temperaturen (55) untersucht wurde, das wiederholte Auftauen und Einfrieren, Alkalisieren und Dialysieren gegen Alkali (110) können ausreichen, um den genannten Effekt erzielen. Man kann die Integrität der Membran auch mechanisch durch Ultraschall zerstören (110). Bei der Wahl der richtigen Konzentration aktivieren auch viele Detergentien, von ihnen wurden folgende untersucht: Triton X 100 (50, 59, 108, 154, 195), Digitonin (64), Äthanol (116), Cutscum, Lubrol 12A-9, Renex 690 (50), Brij 58 (145) mit den stärksten Aktivierungseigenschaften und Lubrol WX (112).

Die UDP-Glucuronyltransferasen können sogar von ihren eigenen Substraten positiv beeinflußt werden, dazu zählen : Bilirubin (152, 154, 188), p-Nitrophenol (176), Gallensäuren (50, 110, 194). Auch enzymatischer Abbau der Phospholipide befreit das aktive Zentrum der UDP-Glucuronyltransferasen teilweise von seiner Latenz: Phospholipase A (189, 191, 194), Phospholipase C (175), Trypsin (35, 100). Daneben gibt es noch viele andere Stoffe, die eine Aktivierung bewirken können: Diaethylnitrosamin beseitigt das Constrainment der Mikrosomen von Gunn-Ratten vollkommen (130, 165), ebenso organische Quecksilberverbindungen (195), Piperonylbutoxid (108), N-Aethylmaleimid (195) und organische Thio - verbindungen (159).
Auf einen ganz anderen Mechanismus beruht die In-vivo-Stimulierung der UDP-Glucuronyltrasnferasen durch UDPNAcG, das als allosterischer Effektor nur auf native Mikrosomen eine Wirkung zeigt (191, 174).

Aus dem Gesagten muß geschlossen werden, daß für die Messung der UDP-Glucuronyltransferaseaktivität in Mikrosomen nur vollaktiviertes Material verwendet werden sollte, da anderenfalls unkontrollierte Einflüsse die Interpretation erschweren würden. Dies sind Einflüsse, die durch Lagerung, die Substrate selbst oder Verunreinigungen mit Detergentien entstehen. Um diese Forderung zu erfüllen, wurden in der vorliegenden Untersuchung das Detergens eingesetzt, das die stärksten Aktivierungseigenschaften besitzt:

Brij 58 (145).

1.2.2 Die Heterogenität der UDP-Glucuronyltransferasen

Ein Hauptziel der Forschung der letzten Jahre auf diesem Gebiet war die Untersuchung, ob die Konjugation der verschiedenen Aglykone mit Glucuronsäure von einem Enzym unspezifischer Bindung katalysiert wird, dessen Aktivität durch die Phospholipidumgebung modifiziert wird, oder ob die andere Möglichkeit realisiert ist, daß es ein System nah verwandter Enzyme gibt, die eine enge Spezifität für ein umschriebenes Spektrum von Substanzen im Sinne eines selektiven Rezeptors besitzen (151, 155). Eine endgültige Klärung dieses Problems ist bis zum heutigen Tage noch nicht erfolgt, obwohl die meisten Untersucher für die Existenz von zumindest zwei oder drei (42, 33) Formen plädieren. Für alle Substrate gilt auf jeden Fall generell, daß einehohe Lipophilie eine schnelle Umsetzung begünstigt (127). Die Literatur, die diese Fragestellung behandelt, beschäftigt sich fast ausschließlich mit Ergebnissen, die an Rattenlebermaterial gewonnen worden sind.

Es gibt verschiedene Strategien, die Heterogenität der UDP-Glucuronyltransferasen zu untersuchen. Ein Teil der Forscher macht sich den unterschiedlichen Einfluß von Metallionen (6) zu nutze, andere die Eigenschaft der In-Vivo-Induzierbarkeit (siehe unten), wobei sich zumindest zwei verschieden stimulierbare Formen zeigen (26, 35, 38, 39, 75, 76, 185).

Entsprechende Resultate erhält man, wenn man die fetale und postpartale Entwicklung der Aktivität der UDP-Glucuronyltransferasen experimentell verfolgt (186). Des weiteren gibt es den Weg, der schließlich endgültige Klärung bringen wird, die einzelnen Formen zu reinigen, um deren Spezifität zu bestimmen, aus partiellen Reindarstellungen können dieselben Schlüsse gezogen werden, die auch aus anderen Versuchsanordnungen gefolgert werden konnten (32, 37, 84, 122, 141, 171, 172). Einige ,,Naturexperimente'' geben sogar Einblick in die Verhältnisse in menschlichem Lebergewebe. Bei Patienten, die an Gilbert-Syndrom leiden, müssen nicht alle UDP-Glucuronyltransferasen betroffen sein (9, 25, 41), entsprechende Verhältnisse finden sich bei Gunn-Ratten (35). Stellt man die Ergebnisse von In-vitro-Hemmversuche zusammen, finden sich sowohl die Hypothese unterstützende (153, Untersuchungen am menschlichen Material 31) als auch widersprechende Resultate (103, 126). Daneben spricht auch einiges für eine weitere Unterteilung der Gruppen (79, 126), wie sie unten dargestellt wird. Eine gewisse Sonderstellung innerhalb einer der Unterformen scheint die bilirubinkonjugierende Form (79, 81) zu zeigen, gefunden an Rattentumoren (40), Patienten mit Gilbert-Syndrom (9) oder auch in normalen Rattenlebern (152, 154), obwohl auch diese Ergebnisse nicht unwidersprochen bleiben (123, 148).

Wenn man alle Ergebnisse wertet, muß man von fol-

gender Hypothese ausgehen, daß zumindest zwei Hauptformen existieren, die sich durch ihre In-vivo-Induzierbarkeit differenzieren lassen, eine davon läßt sich noch in zwei Unterformen einteilen.

Form I : Induzierbarkeit durch 3-Methylcholanthren, Entwicklung in der spätfetalen Phase bei Ratten
Substratspezifität:
1-Naphthol, p-Nitrophenol, 2-Aminophenol, 3-Hydroxybenzo(a)pyren (38), N-Hydroxy-2-Naphthylamin (38, 41), 2-Aminobenzoat, 4-Methylumbelliferon, 5-Hydroxytryptamin, Oestron (181)

Form II : Induzierbarkeit durch Phenobarbital, Entwicklung postpartal bei Ratten
Unterform II A: Substratspezifität:
Morphin, Chloramphenicol, 4-Hydroxybiphenyl, Lithocholsäure, Testosteron (181), ß-Oestradiol, Phenolphthalein
Unterform II B: Substratspezifität:
Bilirubin, Chenodeoxycholsäure (Mensch 117)

Es muß betont werden, daß sich diese Einteilung auf Untersuchungen an Ratten stützt und in der Zukunft wohl noch weitere Modifikationen zu erwarten sind.

1.2.3 Unterschiede in der Aktivität der UDP-Glucuronyltransferasen

Die Aktivität der vorhandenen UDP-Glucuronyltransferasen ist von Organ zu Organ, von Species zu Species (71, 105, 107) verschieden. Darüberhinaus kann die Aktivität auch durch Induktoren, durch Leberveränderungen und systemische Erkrankungen beeinflußt werden, aber sie könnte auch durch die Ernährung verändert werden (19, 68, 87, 100, 150, 149, 157).

1.2.3.1 In-Vivo-Induktion der UDP-Glucuronyltransferasen

Aus vielen Untersuchungen an Tieren (143, 144) ist bekannt, daß die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme der Leber durch einige Substanzen induziert werden, wenn diese in den Organismus gelangen. Dieser Effekt läßt sich klar von der In-vitro-Aktivierung abgrenzen, weil bei der Induktion eine Enzymvermehrung stattfindet (35, 51), während die In-vitro-Aktivierung nur die Eigenschaften des Enzyms modifiziert. Entsprechende Verhältnisse lassen sich auch bei den UDP-Glucuronyltransferasen nachweisen. Auf ihre induzierenden Eigenschaften sind besonders die Barbiturate untersucht worden, allen voran Phenobarbital (2, 17, 43, 77, 118, 125, 163, 185, 186), daneben aber auch 3-N-Phenylbarbital (2) und 3-N-Cyclohexylbarbitursäure (2). Induzierendes Potential besitzen auch Steroide, Spironolacton, Pregnenolon-16-alpha-carbonitril, 3-beta-Hydroxy-20-oxo-5-pregnan-16-carbonitril (160, 161), trans-Stilbenoxid (64) -nicht Cortison (158)-, daneben

auch Arzneimittel wie Rifampicin (45, 138), Clofibrat (72, 115), Cumarin (98), Disulfiram (87), Aminopyrin (89), Antipyrin (134), aber auch Tetrachlorkohlenstoff (36, 98, 135). Eine weitere wichtige Gruppe bilden die Kanzerogene, 3,4-Benzpyren (17), 3-Methylcholanthren (23, 32, 35, 37, 43, 77, 162, 186). Aus klinischen Beobachtungen kann geschlossen werden, daß man auch im menschlichen Organismus mit Induktionsphänomenen rechnen muß. Sowohl Phenobarbital als auch Rifampicin verkürzen die Halbwertszeit verschiedener Medikamente wie Steroidhormone, Aminopyrin und Warfarin, was sich in einer Abnahme der Wirkung und Wirkungsdauer bemerkbar macht (44, 58, 121, 129, 131, 139). Daß auch die UDP-Glucuronyltransferasen beeinflußt werden, kann man aus folgenden Tatsachen entnehmen. Phenobarbital erhöht bei Patienten mit Cholestase die Ausscheidung von Gallensäuren-Glucuroniden über die Nieren und bewirkt damit eine Senkung des Serum-Gallensäure-Spiegels (75, 76, 162). Gemeinsam mit Aethanol senkt es den Bilirubinserumspiegel (136, 169, 180) (in der Klinik Anwendung von Phenobarbital bei Icterus neonatorum prolongatus), auch scheint Narkosemedikation einen positiven Einfluß zu besitzen (27), was aber auch ein Membraneffekt im Sinne einer Detergenswirkung sein könnte.

1.2.3.2 Andere Einflüsse auf die UDP-Glucuronyltransferasen

Auch beim Menschen kann man neben der Wirkung von Induktoren feststellen, daß sowohl die Ernährung als auch hormonelle Einflüsse die Aktivität der

UDP-Glucuronyltransferasen verändern können (54, 99, 146). Es ist bekannt, daß bei Nahrungskarenz der Blutspiegel besonders des unkonjugierten Bilirubins ansteigt, sowohl bei gesunden Probanden (170) als auch bei Patienten, die an Gilbert-Syndrom leiden (170), bei der zweiten Gruppe in solch einem Ausmaß, daß diese Tatsache zur Diagnosefindung ausgenutzt werden kann (68). Dieser Anstieg wird bei Gilbert-Patienten durch eine erniedrigte Aktivität der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase bewirkt (157). Ein weiteres Phänomen, das mit diätetischen Einflüssen aus das Enzym erklärt werden kann, ist die Navajo-Gelbsucht (150). Die am besten untersuchte Patientengruppe in Hinsicht auf die Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase ist das Kollektiv der Gilbert-Patienten, sie zeigen eine stark erniedrigte Aktivität (25, 20, 26, 57, 28, 66, 111), während die p-Nitrophenol-konjugierende Form in variablen Mengen auftritt (9).

Bei dieser Erkrankung scheint Phenobarbital keinen induzierenden Einfluß auf das Enzym zu besitzen (66), auch wenn andere Untersucher das Gegenteil behaupten (28, 57). Eine zweite Erkrankung aus dem Formenkreis der primären Hyperbilirubinämien, das Crigler-Najjar-Syndrom, beruht eindeutig auf einem Mangel der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase (9, 133, 182). Das hereditäre Gunn-Syndrom der Ratte dagegen wird durch eine veränderte Affinität des strukturgestörten Enzyms für UDPGA verursacht (35, 130, 165, 181).

Es wurden auch die Einflüsse von Leberveränderungen auf die Enzymaktivitäten untersucht, wobei bis jetzt die Untersuchungen noch kein eindeutiges Bild ergeben. Bezieht man die Aktivität der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase bei zirrhotisch veränderter Leber auf das Feuchtgewicht, konnten keine Abweichungen gegenüber der Norm festgestellt werden (25, 57). Bezogen auf die Menge des mikrosomalen Enzyms scheint sich im nativen Zustand eine Erniedrigung der Aktivität zu zeigen. Im Gegensatz zur Zirrhose konnte die unveränderte Aktivität bei akuter Hepatitis (31, 57, 66) durch Phenobarbital gesteigert werden (57, 66). Im akuten Leberversagen fällt dann die Aktivität ab (66). Die erhöhte Aktivität der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase bei Patienten mit Sichelzellanämie wurde als Induktionseffekt durch das erhöhte Bilirubin gedeutet (111), wobei aber zu bedenken ist, daß Untersuchungen an Mäusefoeten diesen Effekt nicht nachvollziehen lassen (184). Der Einfluß von Alkohol oder Alkoholschäden läßt sich aus der Literatur nicht vollkommen beurteilen (31). Obstruktion der Gallenwege beantwortet der Organismus mit einer leichten Aktivitätserhöhung (25) ganz im Sinne der Beobachtungen bei Sichelzellanämie, während im Rattenorganismus nur eine veränderte Induzierbarkeit nachweisbar ist (160). Bei M. Wilson erweist sich die Aktivität erniedrigt (25), ebenso bei ikterischen Neugeborenen mit einer Obstruktion des Gastrointestinaltraktes (67).

1.3 Ziel der vorliegenden Untersuchung

In der Literatur liegen bis jetzt nur wenige Untersuchungen über UDP-Glucuronyltransferasen im menschlichen Organismus vor, die zum Teil keine eindeutigen Ergebnisse erbracht haben, mit dieser Arbeit sollte ein zusammenfassender Überblick über Einflüsse gegeben werden, die auf die Glucuronyltransferasen der menschlichen Leber wirken. Dazu zählen sowohl die induzierenden Einflüsse körperfremder Stoffe als auch die Veränderungen des Leberparenchyms.
Als Modellsubstanzen für die verschiedenen UDP-Glucuronyltransferasen wurden 1-Naphthol, Morphin und Bilirubin als Aglykone gewählt.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Es wurden nur Chemikalien verwendet, die den höchsten Reinheitsgrad besaßen, der käuflich zu erwerben war.

Amersham-Buchler

1-(1-^{14}C)-Naphthol	25,9 mCi/ml
(N-Methyl -^{14}C)-Morphin-HCl	50,0 mCi/ml

Behringwerke, Marburg

Albumin, Serum-Albumin vom Rind, lyophilisiert

Humanalbumin, lyophilisiert

Boehringer, Mannheim

Uridin-5 -diphospho-glucuronat-Dinatriumsalz (UDPGA)

Uridin-5 -diphospho-N-acetyl-glucosamin (UDPNAcG)

Merck, Darmstadt

Aethylendiamintetraacetat (EDTA)

Amylalkohol

Chloroform

1,2-Dichloraethan

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Essigsäureaethylester

Folin-Ciocalteus Reagenz

Glycin

di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)

Kaliumnatriumtartrat

Kupfersulphat ($CuSO_4$)

Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)

Milchsäure

Naphthalin

Natriumhydroxid

1,4-Di-(2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl))-benzol (POPOP)

2,5-Diphenyloxazol (PPO)

Natriumcarbonat (Na_2CO_3)

Saccharose

Salzsäure (HCl)

Sulfanilsäure

Titriplex 3

Trichloressigsäure (TCA)

Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)

Serva-Feinbiochemica, Heidelberg

Brij 58 A 631

Sigma-Feinchemikalien, St. Louis

Bilirubin

2.2 Geräte

Eppendorf Gerätebau Netheler + Hinz, Hamburg

Eppendorf-Photometer

Eppendorf-Tischzentrifuge

Eppendorf-Rüttler

Eppendorf-Mikropipetten, in den Größen entsprechend dem zu pipettierenden Volumen

M. Christ, Osterode am Harz
Gefriertrockner - Beta
Heräus Minifuge 2, Zentrifuge

Packard
Tri-Carb-Flüssigkeitsszintillationszähler

Beckman Instruments, München
Modell L5-65 Ultrazentrifuge mit Rotor 50 TI

Du-Pont De Nemours - Sorvall, Bad Nauheim
RC-5 Superspeed Refridgerated Centrifuge mit
Rotor SS 34

2.3 Methoden

2.3.1 Gewinnung von Mikrosomen

2.3.1.1 Gewinnung des Probenmaterials von Ratten

Männliche Ratten (Wistar-Ratten, ca. 150 g) wurden ohne vorherige Narkose durch Dekapitation getötet, da bekannt ist, daß selbst eine kurze Aethernarkose (93) oder eine Exposition gegenüber Chloroform (53) die Aktivität mikrosomaler Enzyme beeinflußt. Die Leber wurde sofort darauf freigelegt und die Vena portae nach Durchtrennung der Vena cava inferior mit 10 ml eiskalter physiologischer Kochsalzlösung durchgespült, danach herauspräpariert, zerkleinert und mehrmals mit SVT-Puffer gewaschen. Nachdem die Leberstücke auf Filterpapier grob getrocknet und gewogen worden waren, wurden daraus sofort Mikrosomen

hergestellt.

2.3.1.2 Gewinnung des menschlichen Probenmaterials

Die menschlichen Mikrosomen wurden aus Lebergewebe hergestellt, das bei der routinemäßigen Gewinnung von menschlichen Leberproben zur histologischen Diagnose anfiel. Nachdem ausreichend Material aus Leberblindpunktionen, laparoskopischen Biopsien und intraoperativ entnommenen Keilexzisionen für diagnostische Zwecke bereitgestellt worden war, fielen für die enzymatischen Untersuchungen aus Biopsien im Durchschnitt 10-20 mg, aus Keilexzisionen 500-1000 mg Lebergewebe an. Das Lebergewebe wurde sofort nach Entnahme in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gelagert, bis es zu Mikrosomen aufgearbeitet werden konnte. Diese Zeitspanne dauerte maximal eine Stunde und dürfte keinen Einfluß auf die Aktivität haben (110, 133). Das Probenmaterial wurde falls nötig zerkleinert, auf Filterpapier grob getrocknet und gewogen, danach wurden dann sofort Mikrosomen präpariert.

2.3.2 Mikrosomenpräparation

Zwei verschiedene Methoden der Mikrosomenpräparation wurden angewandt, je nach Menge des zur Verfügung stehenden Leberfeuchtgewichts. Bei bioptischem Material aus menschlichen Lebern, das bis maximal 20 mg wog, wurde eine Mikropräparation durchgeführt, bei Gewebe von intraoperativen Keilexzisionen und von Rattenlebern stand Material von mehr

als 200 mg zur Aufarbeitung zur Verfügung, in diesen Fällen wurde eine Makromethode verwendet.

2.3.2.1 Stammlösungen

SVT-Puffer

Zusammensetzung :

EDTA	2.0 g/l
Saccharose	95.9 g/l
Tris	2.42g/l

eingestellt auf pH 7.5

2.3.2.2 Makromethode der Mikrosomenpräparation

Bei Gewebe aus intraoperativ gewonnenen Keilexzisionen oder aus Rattenlebern fiel mehr als 200 mg Gewebe zur Aufarbeitung an. In diesen Fällen wurden die Mikrosomen nach einer ,,Makromethode'' hergestellt.

Die Leberproben wurden mit SVT-Puffer auf das 6-Fache ihres Gewichtes aufgefüllt und dann mit einem Teflonpistill unter Eiskühlung homogenisiert. Es wurde versucht, diesen Vorgang zu standardisieren, indem 2 min lang homogenisiert wurde und das Pistill bei 1000 U/min jeweils 10 mal auf- und abgeführt wurde. Dieses Homogenat wurde zur Mikrosomenpräparation herangezogen.

Mikrosomenpräparatipn :

Nachdem eine kleine Probe entnommen worden war, um den Proteingehalt im vollständigen Homogenat bei Bedarf bestimmen zu können, wurde das restliche Volumen in Portionen zu 12 ml aufgeteilt, diese Pro-

ben wurden in einer RC-5 Superspeed Refridgerated Centrifuge bei 4°C zentrifugiert. Nachdem 10 min lang mit 500 g, 10 min mit 1000 g und weitere 10 min mit 10 500 g zentrifugiert worden war, wurde der erhaltene Überstand vom Niederschlag getrennt und in ein 10 ml Nitrocellulose-Gefäß überführt. Der verbliebene Niederschlag wurde mit Puffer resuspendiert und in der gleichen Weise zentrifugiert. Dieser nun erhaltene Niederschlag setzt sich aus Nuclei, Mitochondrien, Lysosomen und Peroxisomen (NMLP-Fraktion) zusammen. Der erste und der zweite Überstand wurden in den Nitrocellulose-Gefäßen vereinigt und gemischt, danach in einer Beckman L5-65 Ultrazentrifuge mit einem Rotor 50 TI bei 0°C mit 105 000 g 45 min lang zentrifugiert, der erhaltene Niederschlag besteht aus der mikrosomalen Fraktion (R-Fraktion).
Der Niederschlag wurde aus den Nitrocellulose-Gefässen ausgeschnitten, abgeschabt und in SVT-Puffer resuspendiert.

2.3.2.3 Mikromethode der Mikrosomenpräparation (70)

Aus bioptischem Material von menschlichen oder tierischen Lebern konnten Gewebeproben mit einem Feuchtgewicht von 5 bis 20 mg Protein verarbeitet werden. Diese Leberproben wurden mit SVT-Puffer, etwa 4-fache Menge des eingewogenen Lebergewichtes, in einem Teflongefäß unter Kühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde danach mit SVT-Puffer auf eine endgültige Verdünnung von 1 zu 50 gebracht,

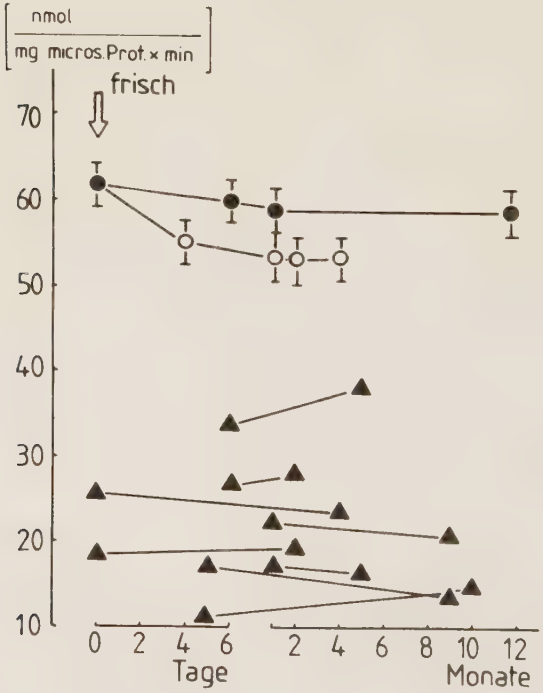
Abbildung 3

Stabilität bei Lagerung

Ratte: tiefgefroren ○ n = 5

lyophilisiert ● n = 5

Mensch: lyophilisiert ▲ Einzelbeobachtungen



was einer Konzentration von etwa 15 bis 20 mg Leber/ml entsprach. Die Mikrosomenpräparation wurde in kleineren Gefäßen nach der von Fleischmann et al. (70) beschriebenen Methode durchgeführt.

2.3.3 Gefriertrocknung der Mikrosomen

Die resuspendierten Mikrosomen-Fraktionen wurden in genau definierten Portionen in Vakuumampullen abgefüllt, Inhalt und Volumen wurden genau katalogisiert und auf die Ampullen geschrieben. Diese wurden sofort in einer Trockeneis-Azeton-Mischung durchgefroren und anschließend an einem Gefriertrockner (Christ Gefriertrockner) meist über Nacht getrocknet, bis das ganze Wasser entzogen war. Ein Auftauen der Probe tritt bei dieser Vorgehensweise nicht aut. Nach Beendigung der Lyophilisation wurden die Vakuumampullen unter Erhaltung des Vakuums zugeschmolzen.

2.3.4 Lagerung der Mikrosomen

Die Mikrosomenlyophilisate wurden im Dunklen bei minus 20 ^{o}C gelagert.

2.3.5 Lösen der Mikrosomen

Vor einer Messung wurden die Vakuumampullen aufgebrochen und in Mikrosomen mit eiskaltem bidestilliertem Wasser resuspendiert.

2.3.6 Stabilität der Mikrosomen bei Lagerung als Lyophilisat

Um die Bestimmung rationell machen zu können, wurden die lyophilisierten Mikrosomen über einen Zeitraum von bis zu einem Jahr unter den beschriebenen Bedingungen gelagert. Es muß nachgeprüft werden, in welchem Ausmaß die Aktivität der UDP-Glucuronyltransferase in diesem Zeitraum abnimmt. Als Testenzym wurde die naphtholkonjugierende Form ausgewählt. Es konnte festgestellt werden, daß bei der Ratte keine nennenswerte, beim Menschen eine 10prozentige Minderung der Reaktionsgeschwindigkeit bei den gelagerten gegenüber den frischen oder nur kurze Zeit aufbewahrten Mikrosomen festgestellt werden konnte.
Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt.

2.3.7 Die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase

2.3.7.1 Prinzip der Meßmethode

Zur Messung der Aktivität der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase wurde als zu konjugierendes Substrat radioaktiv markiertes 1-Naphthol eingesetzt. Nach beendeter Inkubation wurde das freie, nicht umgesetzte 1-Naphthol und das 1-Naphthol-Glucuronid aufgrund ihrer verschiedenen Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln durch eine einfache Extraktion getrennt. Bei diesem Vorgehen bleibt das hydrophile Glucuronid in der wässrigen Phase zurück, während das 1-Naphthol fast ausschließlich in der organischen Phase zu finden ist. Durch Mes-

sung der Radioaktivität von Aliquots der wäßrigen Phase kann die Menge des umgesetzten Substrates bestimmt werden, wobei die Menge des nicht umgesetzten 1-Naphthol in der wäßrigen Phase beachtet werden muß, die sich leicht durch Messung von Leerwerten errechnen läßt.

2.3.7.2 Stammlösungen

Die Stammlösungen wurden, falls nicht jedesmal frisch angesetzt, nicht länger als 2 Wochen bei $4^{o}C$ gelagert. Die Lösung von UDPGA wurden für jede Bestimmung frisch bereitet.

Substanz	Konzentration
Tris-HCl Puffer eingestellt auf pH 7,4	400 mM
Magnesiumchlorid	200 mM
1-Naphthol in 1 Proz. Dimethylsulfoxid	6.7 mM
1-(1-^{14}C)-Naphthol	5.0 uCi/ml
Brij 58	1,3 Prozent
UDPGA	60 mM
Glycin-TCA-Puffer eingestellt auf pH 2,2	600 mM / 400 mM

2.3.7.3 Reagentienmischung

Aus den Stammlösungen wurden für jeden Bestimmungsansatz eine Reagentienmischung hergestellt mit folgender Zusammensetzung:

Tris-HCl-Puffer	20 Volumina
Magnesiumchlorid	2 Volumina
1-Naphthol	6 Volumina
1-(1-^{14}C)-Naphthol	4 Volumina
Brij 58	1 Volumen

2.3.7.4 Ausführung der Enzymbestimmung

Die Reaktionen wurden alle in Eppendorf-Reaktionsgefäßen ausgeführt. Sämtliche Lösungen wurden auf die Temperatur von 0°C gebracht.

in ein eisgekühltes Gefäß wird pipettiert	Leerwert	Probe	Konzentration im Ansatz
Reagentienmischung	50 ul	50 ul	
Tris-HCl-Puffer			110. mM
Magnesiumchlorid			5.5 mM
1-Naphthol			.55mM
1-(1-^{14}C)-Naphthol			.28uCi
Brij 58			.012 o/o
Microsomen	50 ul	50 ul	

Vorinkubation des Reaktionsgemisches bei 37°C für 5 min. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von UDPGA gestartet.

UDPGA	-	10 ul	5.5 mM
Wasser	10 ul	-	

Nach der Zugabe von UDPGA bzw. Wasser wird der Ansatz gut gemischt und dann unter ständigem Rütteln bei 37°C für 10 min bis 30 min inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wird ein zweiter Puffer zupi-

pettiert, womit auch gleichzeitig das Protein denaturiert und ausgefällt wurde.

Glycin-TCA-Puffer	100 ul	100 ul	

Die Proteinfällung wurde durch Lagerung des Gemisches bei $0^{o}C$ für 15 min vervollkommnet. Das denaturierte Protein wurde in einer Heräus-Minifuge-2-Zentrifuge bei 2000 g 5 min lang abzentrifugiert, um Quencheffekte bei der Messung der Radioaktivität so weit wie möglich auszuschließen.
Zur Extraktion des freien 1-Naphthols wurden 150 ul des obigen Gemisches nach der Proteinfällung mit 200 ul Chloroform versetzt und 15 min in einem Eppendorf-Tischrüttler geschüttelt. Zur Trennung der Phasen wurde nochmals zu den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Aliquots der wäßrigen Phase zu je 50 ul wurden zu 10 ml Bray'scher Szintillationsflüssigkeit pipettiert, um so die in der wäßrigen Phase verbliebene Radioaktivität zu bestimmen.

2.3.7.5 Berechnung der Enzymaktivität

Die in der Reaktionslösung enthaltene Radioaktivität wurde ebenfalls für jeden Ansatz bestimmt, indem Aliquots von 50 ul gemessen wurden. Dieser Wert wurde als Standard benützt, so lassen sich Pipettierfehler, die durch das Zusetzen der radioaktiv markierten Substanz entstehen könnten, ausgleichen.
Als weitere Kontrolle wurde bei jeder Bestimmung ein Standard-Mikrosomenpräparat mitgemessen. Von den Probenwerten wurden die Ergebnisse des Leer-

wertes abgezogen, so erhielt man die effektiv umgesetzte Radioaktivität. Alle Messungen wurden als Doppelwerte ausgeführt. Die Radioaktivität wurde in einem Packard Tri-Carb-Flüssigkeitsszintillationszähler jeweils 2 mal 5 min gemessen.

Berechnung:

Z_{Probe} : Zählrate von 50 ul der polaren Phase einer Probe in dpm

$Z_{Leerwert}$: Zählrate von 50 ul der polaren Phase des Leerwertes in dpm

$Z_{Standard}$: Zählrate von 50 ul der Reagentienlösung des Ansatzes in dpm

$V = 4{,}2 \times 10^3$ (Verdünnungsfaktor)

$M_{Naphthol}$ = 60,909 nmol (Menge des eingesetzten 1-Naphthol in nmol)

$M_{Protein}$: Menge des eingesetzten Proteins in mg

$t_{Inkubation}$: Inkubationszeit in Minuten

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{(Z_{Probe} - Z_{Leerwert}) \times M_{Naphthol} \times V}{Z_{Standard} \times t_{Inkubation} \times M_{Protein}}$$

$$\text{Einheit} = \frac{\text{nmol}}{\text{mg mikrosomales Protein} \times \text{min}}$$

2.3.7.6 Grundlagen der Methode (108)

Die Methode zur Bestimmung der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase basiert auf einer Arbeit von Lucier et alii aus dem Jahre 1971. Sie wurde auf eine Mikromethode umgestellt, um Mengen aus Nadelbiopsiematerial bestimmen zu können.

2.3.8 Die Morphin-UDP-Glucuronyltransferase

2.3.8.1 Prinzip der Meßmethode

Als Substrat der UDP-Glucuronyltransferase wurde radioaktiv markiertes Morphin-Hydrochlorid eingesetzt. Nach Beendigung der Inkubation konnte das freie Morphin-Hydrochlorid, das nicht umgesetzt worden war, nicht ohne weiteres vom konjugierten Morphin durch einfache Extraktion abgetrennt werden, weil die Löslichkeitseigenschaften von Substrat und Produkt zu ähnlich waren. Deshalb mußte die Lipophilie des nicht konjugierten Morphin-Hydrochlorids erhöht werden, dies geschah, indem es in seine freie Base verwandelt wurde. Danach ist eine Extraktion durch zweimaliges Ausschütteln möglich, auch wenn in der wäßrigen Lösung noch relativ viel davon verbleibt, was sich in einem recht hohen Leerwert bemerkbar macht. Durch Aliquots der wäßrigen Phase konnte die Menge des umgesetzten Substrates bestimmt werden, unter Berücksichtigung des Nullwertes.

2.3.8.2 Stammlösungen

Alle Lösungen wurden nicht länger als maximal 2 Wochen bei $4^{o}C$ im Dunklen gelagert. Die Lösung von UDPGA wurde für jede Bestimmung frisch angesetzt.

Substanz	Konzentration
Tris-HCl-Puffer	400 mM
eingestellt auf pH 7.4	
Magnesiumchlorid	100 mM
Morphin-HCl, Lösung A	30 mM
(N-Methyl-^{14}C)-Morphin-HCL	5.0 uCi/ml
Brij 58	0,31 o/o
UDPGA	60 mM
Trichoressigsäure	10 o/o
di-Kaliumhydrogenphosphat	40 o/o
Morphin-HCl, Lösung B	0,1 o/o
Dichloraethan / Amylalkohol	70/30 (=V/V)
Natriumhydroxid	1 M

2.3.8.3 Reagentienmischungen

Aus den Stammlösungen wurden für jeden Bestimmungsansatz Reagentienmischungen mit folgender Zusammensetzung frisch hergestellt:

Reagentienmischung A

Tris-HCl-Puffer	10 Volumina
Magnesiumchlorid	2 Volumina
Morphin-HCl, Lösung A	2 Volumina
(N-Methyl-^{14}C)-Morphin-HCl	2 Volumina
Brij 58	4 Volumina

Reagentienmischung B

Diese zweite Reagentienmischung diente dazu, das unkonjugierte Morphin-HCl in seine freie Base zu konvertieren.

di-Kaliumhydrogenphosphat	20 Volumina
Morphin-HCl, Lösung B	5 Volumina
H_2O	3 Volumina

2.3.8.4 Ausführung der Enzymbestimmung

Alle Reaktionen wurden in Eppendorf-Reaktions-Gefäßen ausgeführt. Sämtliche Lösungen wurden auf eine Temperatur von $0^{\circ}C$ gebracht.

in ein eisgekühltes Gefäß wird pipettiert	Leer-wert	Probe	Konzentration im Ansatz
Reagentienmischung A	50 ul	50 ul	
Tris-HCl-Puffer			91 mM
Magnesiumchlorid			4,6 mM
Morphin-HCl			1,4 mM
(N-Methyl-^{14}C)-Morphin-HCl			0.23uCi
Brij 58			0.028 o/o
Mikrosomen	50 ul	50 ul	

Vorinkubation des Reaktionsgemisches bei $37^{\circ}C$ für 5 min. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von UDPGA gestartet.

UDPGA	-	10 ul	5.5 mM
Wasser	10 ul	-	

Nach der Zugabe von UDPGA bzw. Wasser wurde der Ansatz gut gemischt und dann unter ständigem Rütteln bei 37°C für 30 bis 60 min inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion und zur Fällung des Proteins wurde eiskalte Trichloressigsäure zupipettiert.

Trichloressigsäure	50 ul	50 ul	

Die Proteinfällung wurde durch Lagerung des Reaktionsgemisches bei 0°C für 15 min vervollkommnet. Das denaturierte Protein wurde, um Quencheffekte zu vermeiden, in einer Heräus-Minifuge-2-Zentrifuge bei 2000 g 5 min lang abzentrifugiert. 100 ul des Reaktionsgemisches wurden mit 20 ul 1 M Natriumhydroxid neutralisiert, dabei gut geschüttelt. Zur Freisetzung der freien Base aus dem nicht umgesetzten Morphin-HCl wurden 250 ul der Reagentienlösung B hinzugefügt.
Danach wurde zweimal mit je 1.5 ml Dichloraethan/Amlyalkohol-Lösung extrahiert, je 30 min. Die organische Phase wurde verworfen. Aliquots der wäßrigen Phase von 250 ul wurden in 10 ml Bray'scher Szintillationsflüssigkeit gemessen.

2.3.8.5 Berechnung der Enzymakzivität

Die Berechung erfolgte entsprechend dem Ansatz für die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase, die in der Reagentienmischung enthaltene Radioaktivität wurde als Standard benützt. Eine Standardmikrosomenprobe lief bei jeder Messung als Kontrolle mit.

Alle Proben wurden als Doppelwerte bestimmt.

Berechnung:

Z_{Probe} : Zählrate von 250 ul der polaren Phase einer Probe in dpm

$Z_{Leerwert}$: Zählrate von 250 ul der polaren Phase in dpm

$Z_{Standard}$: Zählrate von 50 ul der Reagentienmischung des Ansatzes in dpm

V = $2{,}368 \times 10^3$ (Menge des eingesetzten Morphin-HCl in nmol)

$M_{Morphin}$ = 154 nmol (Menge des eingesetzten Morphin-HCL in nmol)

$M_{Protein}$: Menge des eingesetzten Proteins in mg

$t_{Inkubation}$: Inkubationszeit in Minuten

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{(Z_{Probe} - Z_{Leerwert}) \times M_{Morphin} \times V}{Z_{Standard} \times t_{Inkubation} \times M_{Protein}}$$

$$\text{Einheit} = \frac{\text{nmol}}{\text{mg microsomales Protein x min}}$$

2.3.8.6 Grundlagen der Methode

Die Methode zur Bestimmung der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase ist auf Arbeiten von Sanchez et al. und Yeh et al. fundiert. Sie wurden stark modifiziert, um sie als Mikromethode anwenden zu können.

2.3.9 Messungen der Radioaktivität

Die Aliquots der polaren Phase wurden in 10 ml Szintillationsflüssigkeit eines Bray'schen Szintillators gemessen, dazu wurde ein Packard Tri-Carb-Szintillationszähler benutzt. Interne und externe Standards wurden bei jedem Meßvorgang berücksichtigt.

Zusammensetzung des Bray'schen Szintillators:

PPO	1.99	g
POPOP	0.2	g
Naphthalin	30	g
Aethylenglykol	10	ml
Methanol	50	ml
Dioxan	440	ml

2.3.10 Die Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase

2.3.10.1 Prinzip der Meßmethode

Aus dem menschlichen Organismus ist die Existenz des glucuronidierten Bilirubins bekannt. Diese Reaktion, das heißt die Konjugation des Gallenfarbstoffes mit Glucuronsäure wurde in vitro nachvollzogen. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Reaktionsabläufen wurde in diesem Falle keine radioaktiv markierte Substanz als Substrat eingesetzt, sondern eine Farbstoffbildung, die Diazotierung mit Sulfanilsäure, angewendet. Mittels eines einmaligen Extraktionsverfahrens konnten umgesetztes und freies Bilirubin getrennt werden, wobei das konjugierte und

deshalb hydrophile Substrat in der wäßrigen Phase verblieb, in der es sodann als Farbstoff photometrisch gemessen werden konnte.

2.3.10.2 Stammlösungen

Alle Stammlösungen wurden nicht länger als maximal 2 Wochen im Kühlraum bei 4°C gelagert. Die Bilirubinstammlösungen wurden im Dunkeln bei gleicher Temperatur nicht länger als 24 Stunden aufbewahrt, während die UDPGA und UDPGA/UDPNAcG-Lösungen für jede Bestimmung frisch bereitet wurden, ebenso die Sulfanilsäure- und Nitrit-Lösung.

Substanz	Konzentration
Tris-HCl-Puffer	1.86 M
eingestellt auf pH 7.6	
Magnesiumchlorid	400 mM
Bilirubin	0.512 mM
Brij 58	1.3 o/o
UDPGA	28.3 mM
UDPGA/UDPNAcG	28.3 / 28.3 mM
in 1.88 mM KCl	
Essigsäureaethylester/	5 / 8 (=V/V)
Milchsäure	
Sulfanilsäure	0.48 o/o
in 0.81 N HCl	
Natriumnitrit	2.4 o/o
Natriumhydroxid	0.25 N
Tris-HCl-Puffer	0.1 M
eingestellt auf pH 7.6	

Herstellung der Bilirubin-Lösung:
Es werden 3.75 mg Bilirubin in 150 ul 0.25 N NaOH gelöst, dazu gibt man eine Lösung von 312.5 mg Albumin in 0.1 M Tris-HCl-Puffer und füllt das Ganze mit demselben Puffer bis auf 12.5 ml Volumen auf.

2.3.10.3 Reagentienmischungen

Aus den Stammlösungen wurden wieder für jede Bestimmung frisch Reagentienmischungen mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

Reagentienmischung A

Tris-HCl-Puffer (1.86 M)	10 Volumina
Magnesiumchlorid	2 Volumina
Bilirubin-Lösung	26 Volumina
Brij 58	2 Volumina

Reagentienmischung B
Das Diazoreagenz, das zur Farbentwicklung des konjugierten Bilirubins eingesetzt wurde, konnte wegen seiner Instabilität nur sehr kurzzeitig gelagert werden und wurde deshalb jeweils wenige Minuten vor seinem Gebrauch aus den entsprechenden Stammlösungen gemischt.

Sulfanilsäure	100 Volumina
Natriumnitrit	3 Volumina

2.3.10.4 Ausführung der Enzymbestimmung

Die Reaktionen wurden alle in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem abgedunkelten Raum ausgeführt.

Sämtliche Lösungen wurden zuvor auf eine Temperatur von etwa 0°C gebracht.

in ein eisgekühltes Gefäß wird pipettiert	Leer-wert	Probe	Konzentration im Ansatz
Reagantienmischung A	50 ul	50 ul	
Tris-HCl-Puffer			189 mM
Magnesiumchlorid			8.1mM
Bilirubin			133 uM
Brij 58			0.025 o/o
Mikrosomen	50 ul	50 ul	

Vorinkubation des Reaktionsgemisches bei 37°C für 5 min. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von UDPGA bzw. UDPNAcG/UDPGA gestartet.

UDPGA/UDPGA-UDPNAcG	-	25 ul	5.66mM
Wasser	25 ul	-	

Nach der Zugabe des Starters bzw. Wasser wurde der Ansatz kräftig gemischt und dann unter ständigem Rütteln bei 37°C für 30 bis 120 min inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion und zur Fällung des Proteins wurde zu 100 ul des Reaktionsgemisches die eiskalte Essigsäureaethylester/Milchsäure-Mischung hinzupipettiert.

Essigsäureaethylester/ Milchsäure	650 ul	650 ul	

Nach dem guten Durchmischen wurde das Reaktionsgefäß zur Vervollständigung der Proteinfällung 15 min eiskalt gelagert, danach in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 9950 g 5 min lang zentrifugiert. Zur Extraktion des nicht umgesetzten Bilirubins in die organische Phase wurde der Ansatz mit 800 ul Chloroform 10 min lang in einem Eppendorf-Tischrüttler geschüttelt, anschließend wurde wieder zu den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Diazotierung des konjugierten Bilirubins wurde mit 10 ul des Reaktionsgemisches B durchgeführt, dann zentrifugiert und zur Farbentwicklung eine Stunde bei Zimmertemperatur im Dunklen gelagert. Das umgesetzte Bilirubin in der wäßrigen Phase wurde durch Messung der Extinktion der diazotierten Form bei 10 mm Lichtweg bestimmt. Um Schlierenbildung zu vermeiden, wurde nochmals direkt vor der Messung zentrifugiert, sofort danach erfolgte die Messung bei 555nm in einem Eppendorf-Photometer.

2.3.10.5 Berechnung der Enzymaktivität

Zur Berechnung der Menge des konjugierten Bilirubins wurde eine Eichkurve - Bilirubinkonzentration gegen die Extinktion des diazotierten Produktes bei 555 nm und 10 mm Lichtweg - aufgestellt. Es ergab sich folgender Extinktionskoeffizient:

$K_{Extinktion} = 52{,}218 \times 10^{3}\ M^{-1}$.

Alle Proben wurden als Doppelwerte bestimmt, bei jeder Bestimmung lief ein Standardmikrosomenpräparat als Kontrolle mit.

Berechnung:

E_{Probe} : Extinktion der polaren Phase der Probe

$E_{Leerwert}$: Extinktion der polaren Phase des Leerwertes

$V = 981{,}25 \times 10^3$ (Verdünnungsfaktor)

$K_{Extinktion} = 52{,}218 \times 10^3\ M^{-1}$ (Extinktionskoeffizient)

$M_{Protein}$: Menge des eingesetzten Proteins in mg

$t_{Inkubation}$: Inkubationszeit in Minuten

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{(E_{Probe} - E_{Leerwert}) \times V}{K_{Extinktion} \times t_{Inkubation} \times M_{Protein}}$$

$$\text{Einheit} = \frac{\text{nmol}}{\text{mg mikrosomales Protein} \times \text{min}}$$

2.3.10.6 Grundlage der Methode (166)

Diese Methode wurde für Mikroansätze adaptiert, um Mikromengen von Protein zu messen.

2.3.11 Die p-Nitrophenol-UDP-Glucuronyltransferase

2.3.11.1 Prinzip der Meßmethode

In diesem Ansatz diente p-Nitrophenol als Aglykon. Da das unkonjugierte p-Nitrophenol in einem Milieu mit pH größer als 7 zum kleinen Teil als Phenolat vorliegt, das bei 405 nm eine ausgeprägte Extinktion besitzt, konnte eine kontinuierli-

che Meßmethode angewandt werden, die die Abnahme der Extinktion benützt, um die umgesetzte Menge des p-Nitrophenol zu bestimmen. Die Reaktion war unter den angegebenen Bedingungen nur 3 min lang linear. Die Prinzipien der Methode stammen von Lueders (110), auch sie wurde auf Mikromethoden adaptiert.

2.3.11.2 Stammlösungen

Alle Lösungen wurden nicht länger als maximal 2 Wochen im Kühlraum bei 4°C gelagert. UDPGA wurde für jede Bestimmung frisch angesetzt.

Substanz	Konzentration
Tris-HCl-Puffer	400 mM
eingestellt auf pH 7.4	
Magnesiumchlorid	230 mM
p-Nitrophenol	4.6mM
Brij 58	1.3o/o
UDPGA	35 mM

2.3.11.3 Reagentienmischung

Die Reagentienmischung wurde vor jeder Messung aus den Stammlösungen frisch bereitet.

Reagentienmischung	
Tris-HCl-Puffer	3 Volumina
Magnesiumchlorid	1 Volumen
Brij 58	1 Volumen
p-Nitrophenol	5 Volumina

2.3.11.4 Ausführung der Enzymbestimmung

Die Reaktion wurde in einer temperierten Meßküvette bei 37°C durchgeführt.

in ein eisgekühltes Gefäß wird pipettiert	Leerwert	Probe	Konzentration im Ansatz
Reagentienmischung	100 ul	100 ul	
Tris-HCl-Puffer			50 mM
Magnesiumchlorid			10 mM
p-Nitrophenol			1 mM
Brij 58			0.057 o/o
Mikrosomen	100 ul	100 ul	

Vorinkubation des Reaktionsgemisches bei 37°C für 5 min. Danach wurde zum Start der Reaktion UDPGA hinzugegeben und in eine vorgewärmte (37°C) Meßküvette überführt.

UDPGA	-	30 ul	4.6 mM
Wasser	30 ul	-	

Die Abnahme der Extinktion wurde während der ersten 3 min bei 2 mm Lichtweg und 405 nm Wellenlänge in einem Eppendorf-Photometer kontinuierliche gemessen.

2.3.12 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Berechnung der Enzymaktivität mußten die eingesetzten Mengen mikrosomalen Proteins bestimmt werden. Dazu wurde die Methode von Lowry ea (198) modifiziert angewendet.

2.3.12.1 Stammlösungen

Substanz	Konzentration
NaOH	1 N
Na_2CO_3-Lösung	
Na_2CO_3	20 g/l
NaK-Tartrat	200 g/l
$CuSO_4$	5 g/l

Substanz	Konzentration
Folin-Reagenz	aus 1:2 verdünnt
TCA	10 o/o

2.3.12.2 Ausführung der Proteinbestimmung

Für jeden Bestimmungsansatz wurde eine Reagentienlösung aus 50 ml Na_2CO_3-Lösung und 1 ml $CuSO_4$-Lösung frisch hergestellt. Alle Untersuchungen wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt.

	Leerwert	Probe
Mikrosomen	-	2,63 ul
SVT-Puffer	2,63 ul	-
Wasser	19,20 ul	19,20 ul
TCA	20,30 ul	20,30 ul

mischen, zentrifugieren, Flüssigkeit restlos absaugen

NaOH	20,30 ul	20,30 ul
Reagentienlösung	200,00 ul	200,00 ul

mischen, schütteln

und exakt nach 10 min

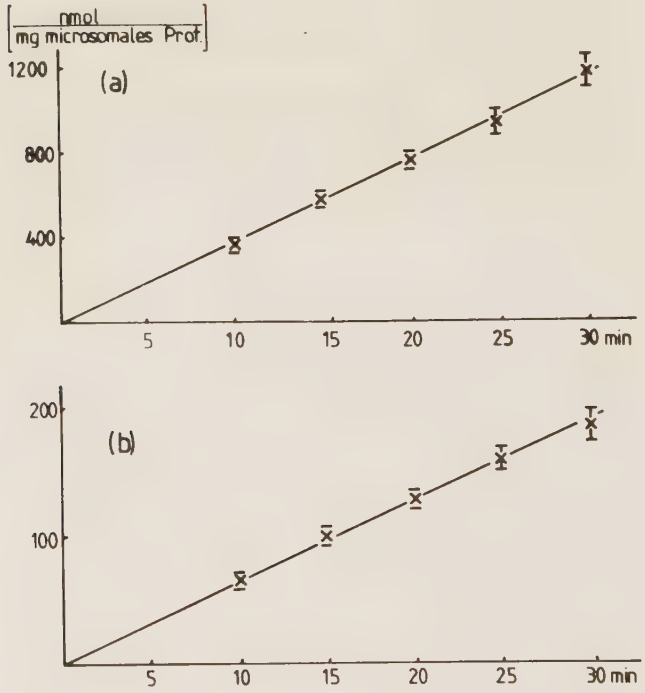
Folien-Reagenz	20,30 ul	20,30 ul

Nach einer Lagerung von 45 min bei Zimmertemperatur zur vollen Entwicklung der Farbe wurde die Extinktion bei 691 nm 10 mm Lichtweg in einem Eppendorf-Photometer gemessen.

Bei jedem Untersuchungsgang wurde eine neue Eichkurve zur Kontrolle mitgemessen, um Pipettierfehler so klein wie möglich zu halten.

Abbildung 4

Zeitabhängigkeit der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase bei Microsomen von (a) Ratte und (b) Mensch



2.3.13 Präzision und Reproduzierbarkeit der Enzymmessungen

Die Präzision des enzymatischen Tests wurde überprüft, indem Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden. Die Reproduzierbarkeit ließ sich durch den Vergleich mit einem Standard-Mikrosomenpräparat berechnen. Dieser Standard wurde bei jeder Meßserie mitbestimmt.
Beide Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1 Präzision und Reproduzierbarkeit der Enzymaktivitätsmessungen

Aglykon	Präzision		Reproduzierbarkeit	
	n	Abweichung	n	Abweichung
p-Nitrophenol	6	2.5 o/o	7	6.1 o/o
Naphthol	13	2.4 o/o	18	5.0 o/o
Morphin	8	4.9 o/o	16	7.0 o/o
Bilirubin	8	5.3 o/o	15	8.9 o/o

3. Ergebnisse

3.1 Enzymkinetische Untersuchungen

3.1.1 Untersuchungen zu der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase

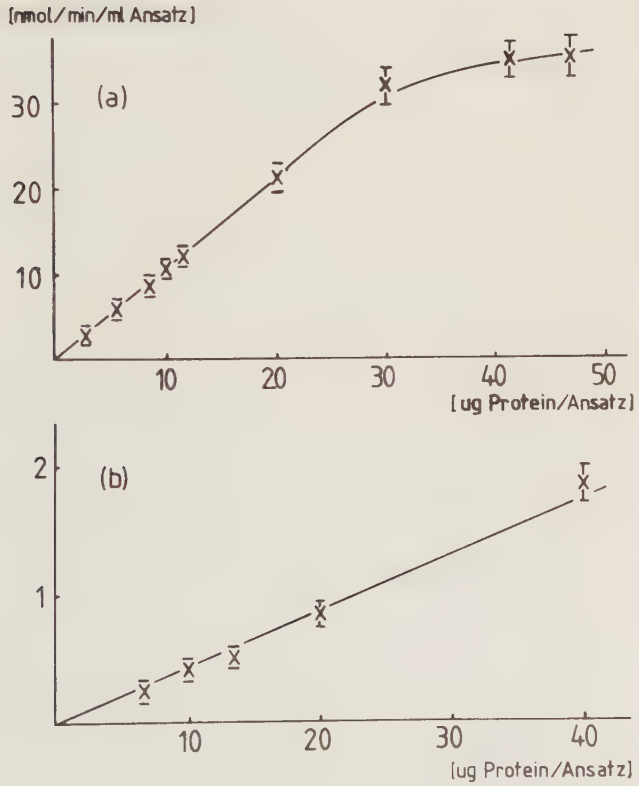
Es muß kurz angemerkt werden, daß alle folgenden Untersuchungen mit den vorher beschriebenen Methoden ausgeführt wurden, und, falls erforderlich, nur das zu untersuchende Substrat in seiner Konzentration variiert wurde. Alle Ansätze enthielten voll aktivierte Mikrosomen.

3.1.1.1 Zeitabhängigkeit der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase

Um die Anfangsgeschwindigkeit einer spezifischen Reaktion messen zu können, muß untersucht werden, ob und wie lange die Meßreaktion linear über die Zeit verläuft, in dieser Zeitspanne kann man davon ausgehen, daß im Ansatz Substratsättigung gegeben ist, eine Voraussetzung für die Linearität des Reaktionsablaufes. Des weiteren spielt dann in diesem Zeitraum eine Aktivitätsveränderung des untersuchten Enzyms keine Rolle. Die Abbildungen 4a und 4b zeigen, daß sowohl die Reaktion für Rattenmikrosomen (durchschnittlich 5 ug mikrosomales Protein pro Ansatz) als auch der für menschliche Mikrosomen (durchschnittlich 11 ug mikrosomales Protein pro Ansatz) zumindest bis zu einem Zeitpunkt von 30 min linear verlief, das heißt, die initiale

Abbildung 5

Proteinabhängigkeit der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase bei Microsomen von (a) Ratte und (b) Mensch



Enzymaktivität mit einer Einpunktmessung bestimmt werden kann. Darüberhinaus wurde bei Verwendung von Rattenlebermikrosomen mit einer sehr hohen Enzymaktivität gearbeitet, die von menschlichen Mikrosomen niemals erreicht wurde, so daß man davon ausgehen kann, daß bei Verwendung menschlicher Mikrosomen wenigstens über einen Zeitraum von 30 min Substratsättigung vorliegt.

3.1.1.2 Proteinabhängigkeit der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase

Wie in der Einleitung beschrieben zielten die vorliegenden Untersuchungen darauf ab festzustellen, ob in menschlichen Lebermikrosomen verschiedene Aktivitäten der Glucuronyltransferasen zu finden sind. Als Meßmethode wurde ein enzymatischer Ansatz gewählt, wobei aus der Menge des umgesetzten Substrates auf die Menge des mikrosomalen Enzyms rückgeschlossen wurde. Aktivierungsphänomene, die durch Lagerung, Verunreinigung mit Detergentien und andere Einflüsse entstehen könnten, wurden durch den Zusatz von Detergentien insofern umgangen, daß nur vollaktivierte Mikrosomen gemessen wurden. Deshalb mußte zu Anfang bestimmt werden, wie die Menge des Produktes von der Menge des eingesetzten Enzyms abhing. Aus der Abbildung 5a läßt sich entnehmen, daß Rattenlebermikrosomen mit normaler Enzymaktivität unter den beschriebenen Bedingungen eine lineare Abhängigkeit bis ungefähr 30 ug mikrosomalen Proteins pro Ansatz zeigten. Im allgemeinen

Abbildung 6

Abhängigkeit der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase von der UDPGA-Konzentration bei Ratten, (a) linear (b) doppelt reziprok

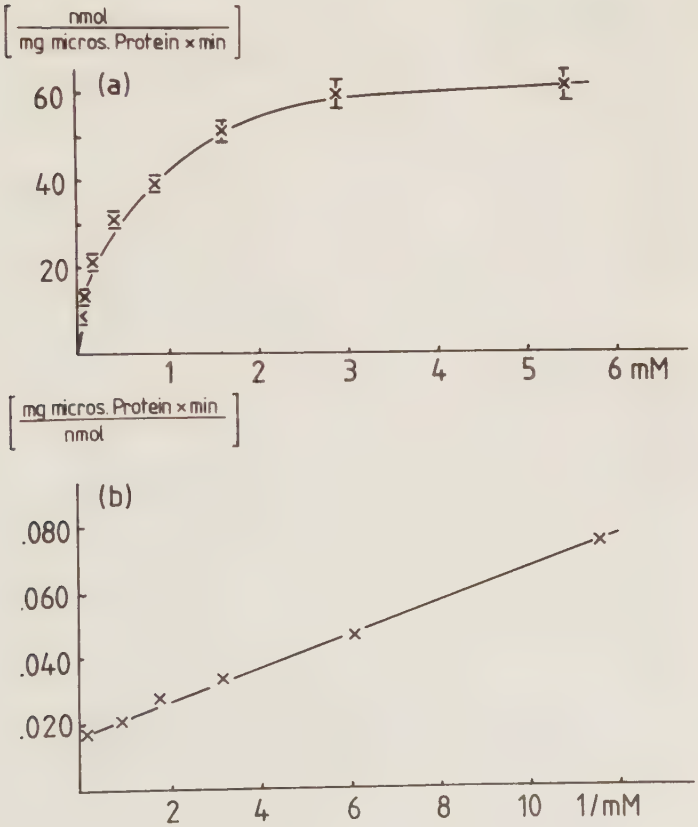
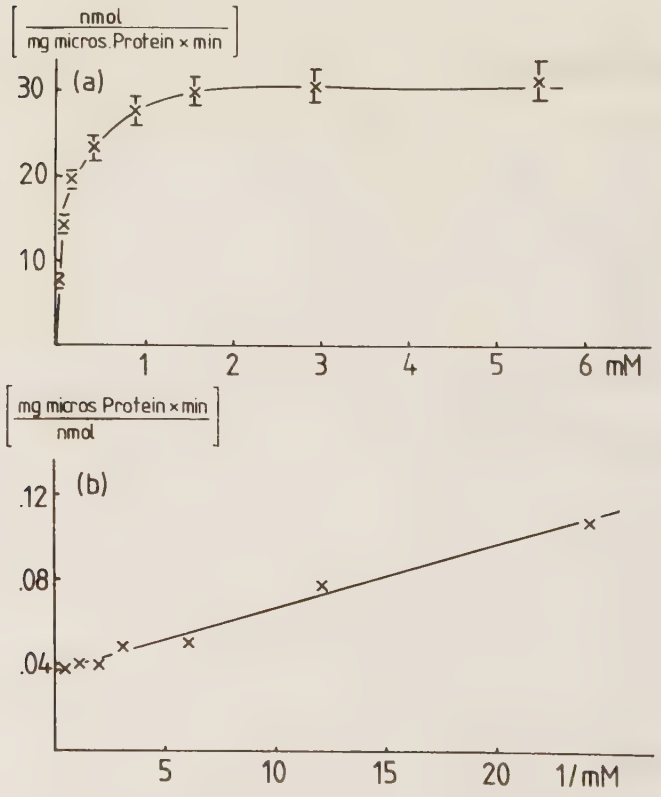


Abbildung 7

Abhängigkeit der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase von der UDPGA-Konzentration bei Menschen, (a) linear (b) doppelt reziprok



wurden bei Messungen der Enzymaktivität von Rattenlebermikrosomen Proteinmengen bis maximal 10 ug mikrosomalem Protein pro Ansatz verwendet, bei höheren Enzymaktivitäten entsprechend weniger. In Abbildung 5b wurde die direkte Korrelation zwischen eingesetzter Enzymmenge und gebildetem Produkt bei menschlichem Material aufgetragen, Linearität besteht bis zu einem Proteineinsatz von 40 ug. Üblicherweise kamen aber nur 5 bis 20 ug zum Einsatz, es sei denn die Aktivität konnte mit dieser Menge nicht gemessen werden, was nur selten der Fall war.

3.1.1.3 Abhängigkeit der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase von der UDPGA-Konzentration

Die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase katalysiert die Konjugation der aktivierten Glucuronsäure an das 1-Naphthol, wobei bei dieser Reaktion neben 1-Naphthol UDPGA als Cosubstrat benötigt wird. Außer der UDPGA-Konzentration blieben bei dieser Untersuchung alle anderen Bedingungen unverändert. Es wurden aktivierte Mikrosomen sowohl aus menschlicher als auch Rattenleber verwendet. Die Abbildungen 6a und 7a zeigen die Abhängigkeit der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase von der UDPGA-Konzentration. In den Abbildungen 6b und 7b wurden dieselben Ergebnisse doppelt reziprok im Sinne eines Lineweaver-Burk-Plots aufgetragen, um die

scheinbaren K_M-Werte für UDPGA entnehmen zu können. Daraus läßt sich leicht die optimale Testkonzentration für UDPGA entnehmen, ferner ist die scheinbar maximale Reaktionsgeschwindigkeit ablesbar. Beide Wertepaare wurden mit den Literaturangaben verglichen, wobei berücksichtigt werden muß, daß K_M-Werte von ungereinigten Enzymen („apparent K_M'') nur eine beschränkte Aussagekraft besitzen. (Tabelle 2)

3.1.1.4 Abhängigkeit der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase von der 1-Naphthol-Konzentration

In diesem Falle wurde nur die 1-Naphthol-Konzentration variiert. Die Abbildungen 8a und 9a zeigen die Ergebnisse für Ratten- bzw. Menschenmikrosomen in linearer Darstellung, die Abbildungen 8b und 9b in doppelt reziproker Weise. Die scheinbaren K_M- und V_{max}-Werte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

3.1.1.5 Die Abhängigkeit der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase von der Mg^{++}-Konzentration

Wie aus der Literatur bekannt ist, kann die Aktivität verschiedener Enzyme, auch der Glucuronyltransferasen, durch die Anwesenheit von Metallionen (5) gesteigert, aber auch gehemmt werden, bei den Glucuronyltransferasen ist ein positiver Einfluß durch die Zugabe von Mg^{++}-Ionen gezeigt worden, der aber durch Ca^{++}-Ionen antagonisiert werden kann (23, 24). Bei der optimalen Mg^{++}-Konzentration von 5.5 mM

Abbildung 8

Abhängigkeit der 1-Naphthol-UDP-Gluconyltransferase von der Naphthol-Konzentration bei Ratten, (a) linear (b) doppelt reziprok

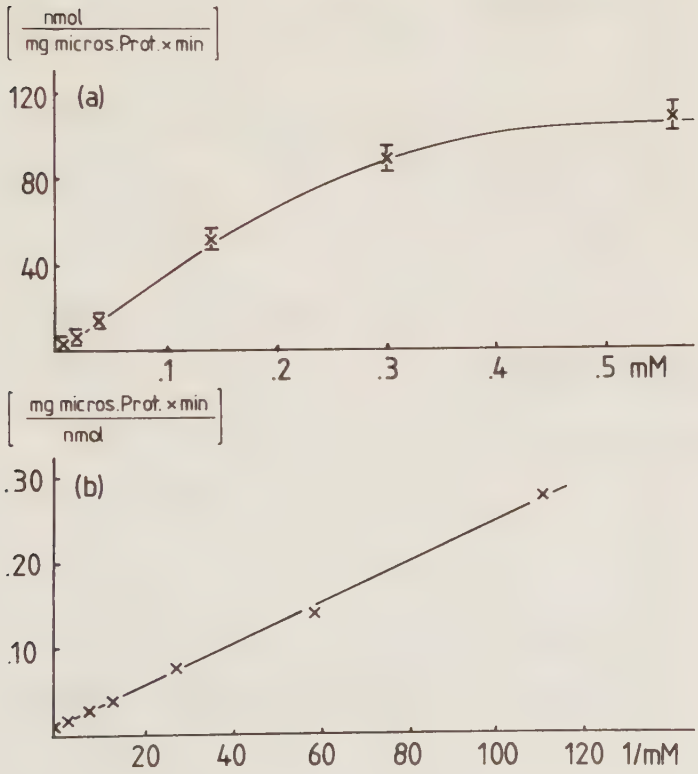
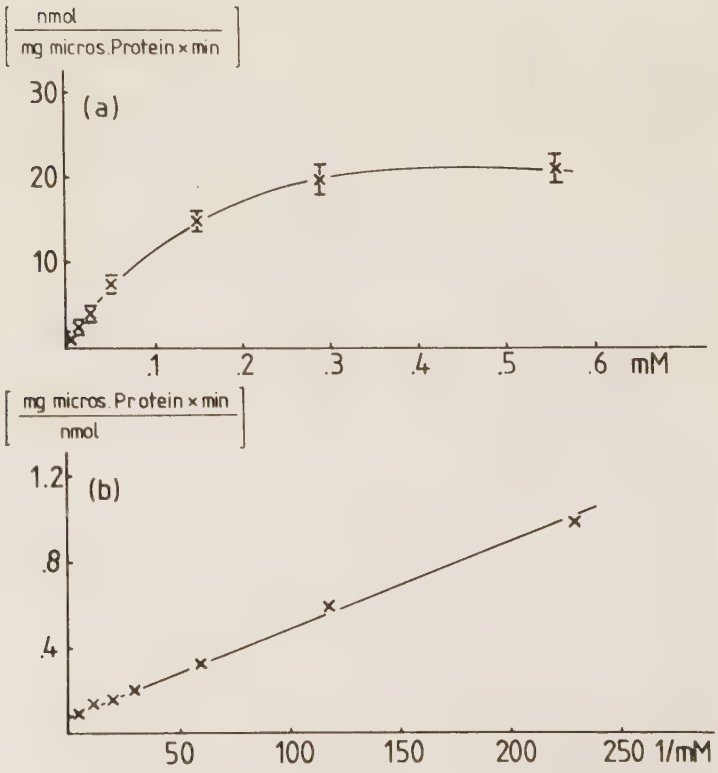


Abbildung 9

Abhängigkeit der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase von der Naphthol-Konzentration bei Menschen, (a) linear (b) doppelt reziprok



ließ sich eine Steigerung der Enzymaktivität in einem Ausmaß von 250 bis 500 o/o (Ratte bzw. Mensch) nachweisen. Bei höheren Konzentrationen konnte zumindest mit menschlichen Lebermikrosomen ein leichter Abfall der maximal stimulierbaren Aktivität beobachtet werden. Für alle weiteren Untersuchungen kam deshalb eine Mg^{++}-Konzentration von 5.5 mM zur Anwendung (Abbildungen 10a und 11a).

3.1.1.6 Abhängigkeit der Naphthol-UDP-Glucuonyltranserase von der Brij 58 Konzentration

Aus den in der Einleitung geschilderten Gründen wurde die Vollaktivierung der Mikrosomen untersucht. Als Detergens kam Brij 58 zum Einsatz, das Vorteile gegenüber dem gebräuchlichen Triton X100 besitzt. Diese liegen in einer höheren stimulatorischen Wirkung und in einem breiteren Gipfel der Vollaktivierungskonzentration. Andere Verfahren, wie z.B. Lagerung, Alkalisierung oder Sonifikation kamen nicht zur Verwendung.Sowohl in menschlichen Lebermikrosomen als auch in Rattenlebermikrosomen war die höchste Aktivierung bei einer Konzentration von 0.01 o/o zu beobachten, obwohl mit verschiedenen Proteinkonzetrationen gearbeitet wurde. Diese Feststellung konnte durch eine Meßreihe mit anderen Proteinkonzentrationen erhärtet werden. Daraus läßt sich entnehmen, daß im Gegensatz zu Triton X100 nicht die Relation zwischen Proteinmenge zu Detergens für den Aktivierungseffekt ausschlaggebend ist, sondern die Konzentration im Ansatz.

Bei diesen Versuchen (Abbildungen 10b und 11b) wurde festgestellt, daß das Ausmaß der In-vitro-Aktivierung bei Rattenmikrosomen mit einer 9fachen Erhö-

Abbildung 10

Abhängigkeit der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase bei Ratten von der (a) Mg^{++}- und (b) Brij 58-Konzentration

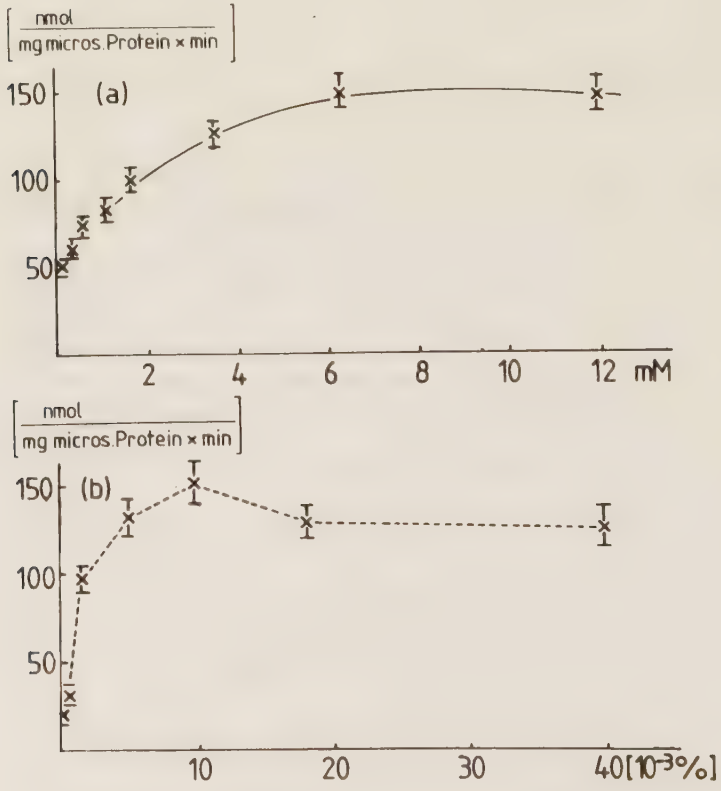


Abbildung 11

Abhängigkeit der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase bei Menschen von der (a) Mg^{++}- und (b) Brij 58-Konzentration

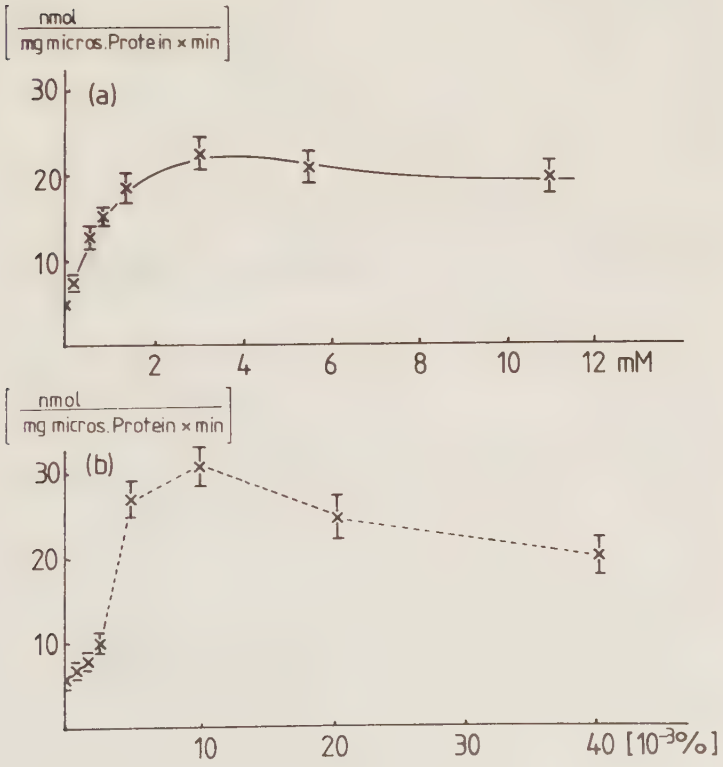
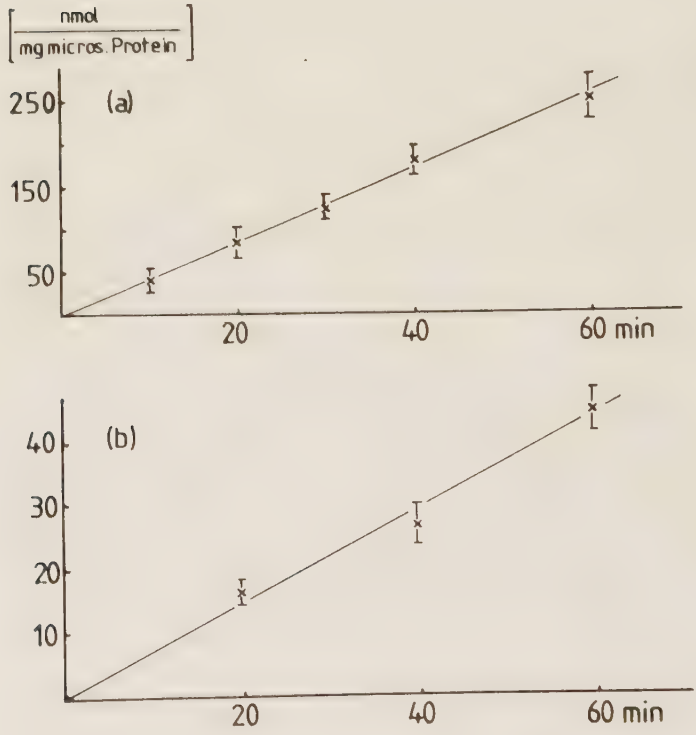


Abbildung 12

Zeitabhängigkeit der Morphin-UDP-GT bei Microsomen von (a) Ratte und (b) Mensch



hung weit größer war, als der Effekt, der bei menschlichem Material erreicht wurde, hier läßt sich eine 4fache Aktivierung beobachten. Das heißt, daß die Latenz der mikrosomalen Glucuronyltransferase in Rattenlebermikrosomen bedeutend größer ist als in Mikrosomen aus menschlichem Gewebe.

3.1.2 Untersuchungen zu der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase

Ebenso wie bei den entsprechenden Untersuchungen der Naphthol-konjugierenden Form wurden diejenigen Bedingungen eingehalten, die im Kapitel „Methoden'' beschrieben sind, alle Versuche wurden mit vollaktivierten Mikrosomen durchgeführt.

3.1.2.1 Zeitabhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase

Dieselben Überlegungen, die oben für die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase angestellt worden sind, gelten auch in diesem Falle.
Die Versuche (Abbildungen 12a und 12b) ergaben, daß die Reaktionsgeschwindigkeiten mit Rattenlebermikrosomen (20 ug mikrosomales Protein) als auch mit menschlichem Material (45 ug mikrosomales Protein pro Ansatz) bis zu 60 min linear verlaufen. Aufgrund dieser Untersuchungen wurden alle Messungen an menschlichen Lebermikrosomen wegen der geringen Aktivität mit einer Inkubationszeit von 60 min durchgeführt. Auf diese Weise war es möglich, die Empfindlichkeit der Methode auf einen Mikroansatz

Abbildung 13

Proteinabhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase bei Microsomen von (a) Ratte und (b) Mensch

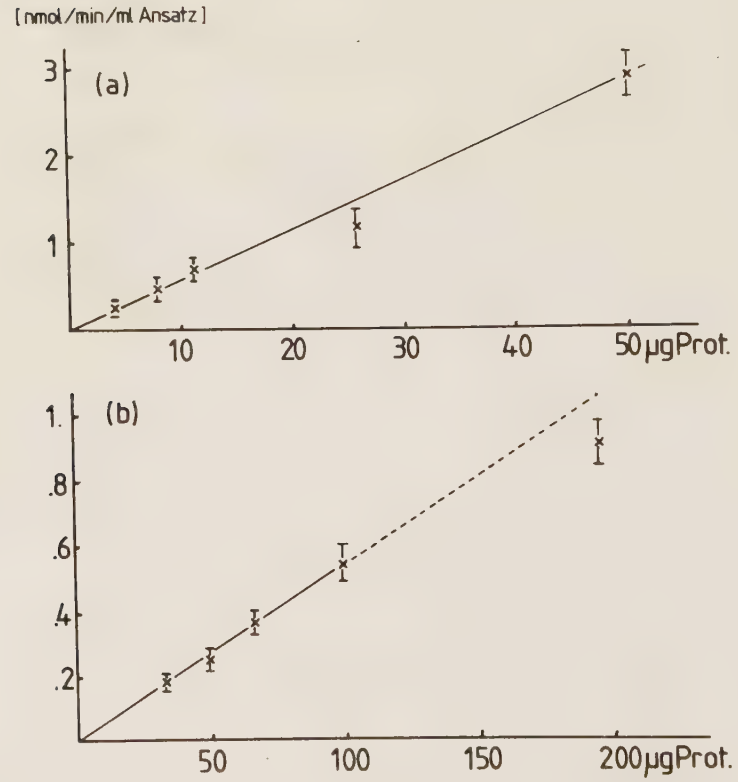


Abbildung 14

Abhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase von der UDPGA-Konzentration bei Ratten, (a) linear (b) doppelt reziprok

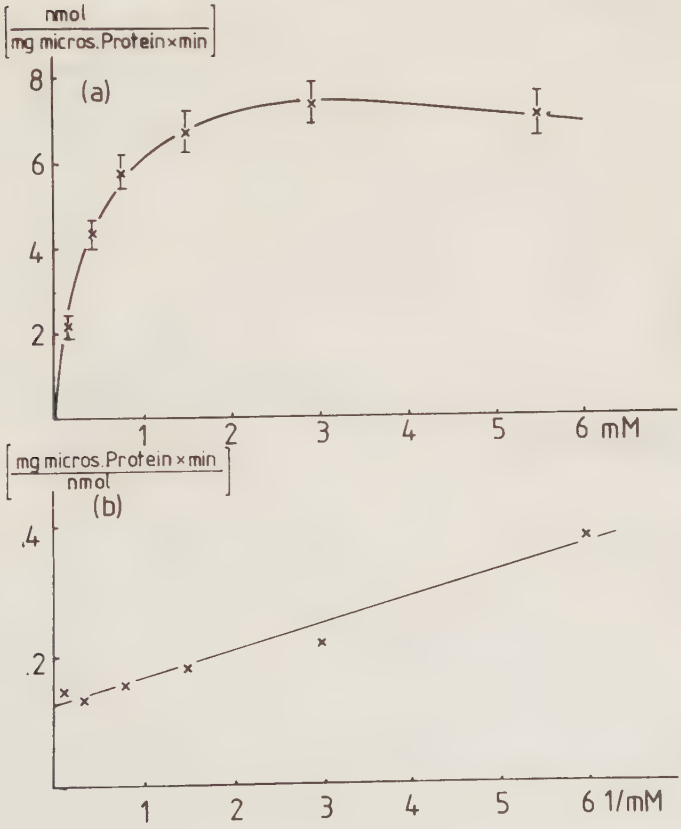


Abbildung 15

Abhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase von der UDPGA-Konzentration bei Menschen, (a) linear (b) doppelt reziprok

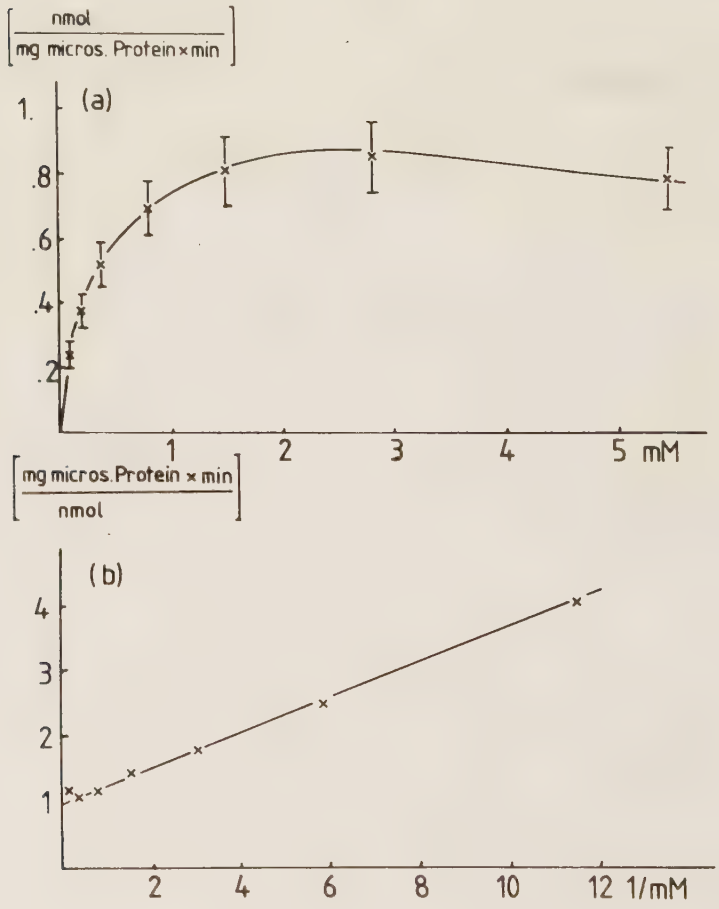


Abbildung 16

Abhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase von der Morphin-Konzentration bei Ratten, (a) linear (b) doppelt reziprok

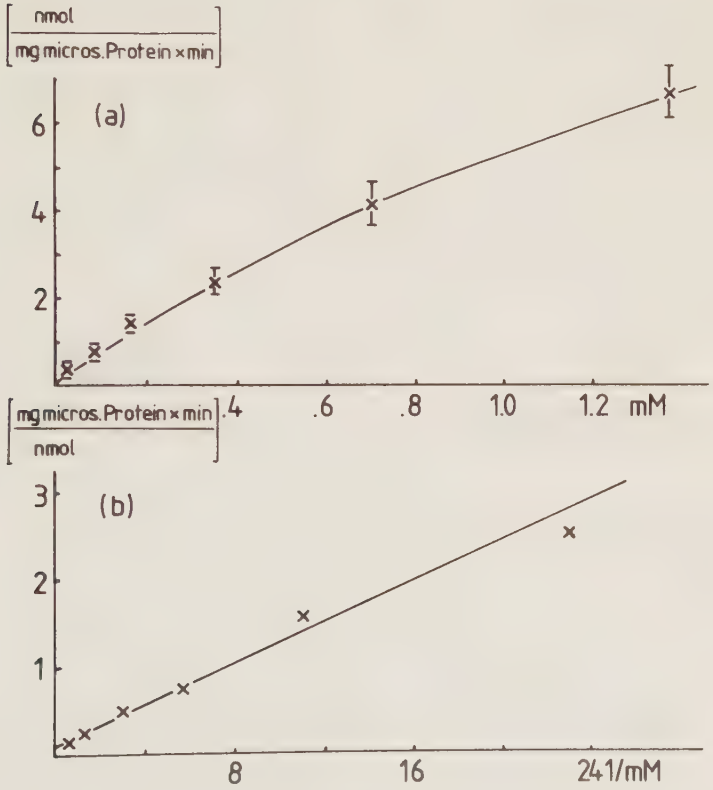
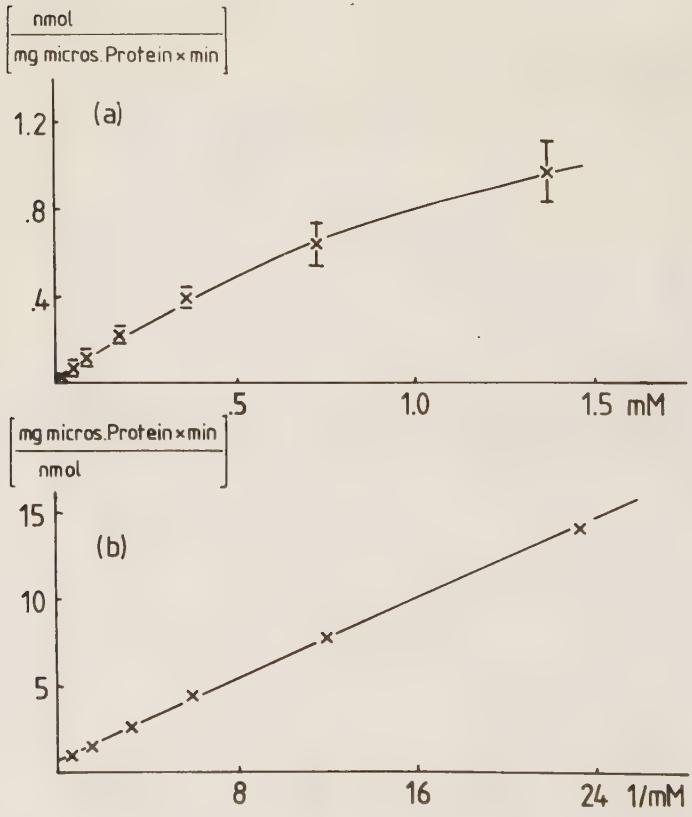


Abbildung 17

Abhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase von der Morphin-Konzentration bei Menschen, (a) linear (b) doppelt reziprok



zu adaptieren. Da die Aktivität der Rattenlebern um das Zehnfache größer war, konnte in diesen Fällen die Inkubationszeit verkürzt werden.

3.1.2.2 Proteinabhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase

Diese Untersuchung zeigte eindeutig, daß eine lineare Abhängigkeit zwischen Menge des eingesetzten Enzyms in Form des mikrosomalen Proteins und dem erhaltenen Produkt bestand. Das Gesagte gilt sowohl für die Rattenlebern als auch für die menschliche Leber (Abbildungen 13a und 13b). Bei einem Einsatz von mehr als 100 ug Protein menschlicher Mikrosomen bestand keine Linearität mehr, eine Größenordnung, die bei den späteren Messungen nie verwendet wurde.

3.1.2.3 Abhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase von der UDPGA-Konzentration

Ebenso wie bei den anderen Glucuronyltransferasen benötigt die Morphin-konjugierende Form als Coenzym das Cosubstrat UDPGA, die aktivierte Glucuronsäure. Um die optimale Konzentration zu ermitteln, wurden die Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration bestimmt (Abbildungen 14a und 15a), deren Optima aus den Lineweaver-Burk-Plots (Abbildungen 14b und 15b) sowohl für die Ratten als auch für Menschen mittels des scheinbaren K_M-Wertes erhalten wurden (Tabelle 2).

3.1.2.4 Abhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase von der Morphin-Konzentration

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen finden sich in den Abbildungen 16a/b und 17a/b sowie Tabelle 2.

3.1.2.5 Abhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase von der Mg^{++}-Konzentration

Die bekannte Abhängigkeit der Glucuronyltransferase von der Anwesenheit von Metallionen zeigte sich in einer Aktivierungszunahme bei einer optimalen Mg^{++}-Konzentration. Dieser Effekt trat bei einer Mg^{++}-Konzentration im Bereich von 3 bis 6 mM in seiner maximalen Ausprägung in Erscheinung (Steigerungen von 200 o/o bei beiden Spezies). Bei höheren Konzentrationen verringerte sich dieser Einfluß der Mg^{++}-Ionen deutlich, deshalb wurde für alle weiteren Untersuchungen eine Konzentration von 4.6 mM gewählt (Abbildungen 18a und 19a).

3.1.2.6 Abhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase von der Brij 58-Konzentration

Der Gipfel der Aktivierung dieser Form der Glucuronyltransferase durch Brij 58 lag bei menschlichen und bei Rattenmikrosomen bei einer Konzentration von 0.02 o/o, obwohl die Proteinmengen in den beiden verschiedenen Untersuchungen sehr unterschiedlich waren. Bei höheren Konzentrationen des Detergens trat eine Abnahme der maximalen Aktivierung in Erscheinung. Bei maximaler Aktivierung konnte eine

Abbildung 18

Abhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase bei Ratten von der (a) Mg^{++}- und (b) Brij 58-Konzentration

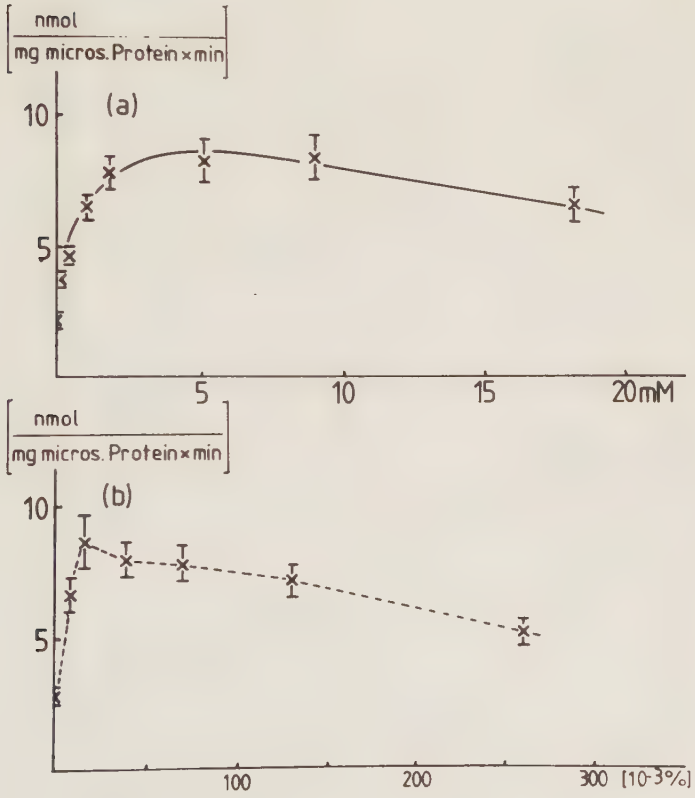


Abbildung 19

Abhängigkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase bei Menschen von der (a) Mg^{++}- und (b) Brij 58-Konzentration

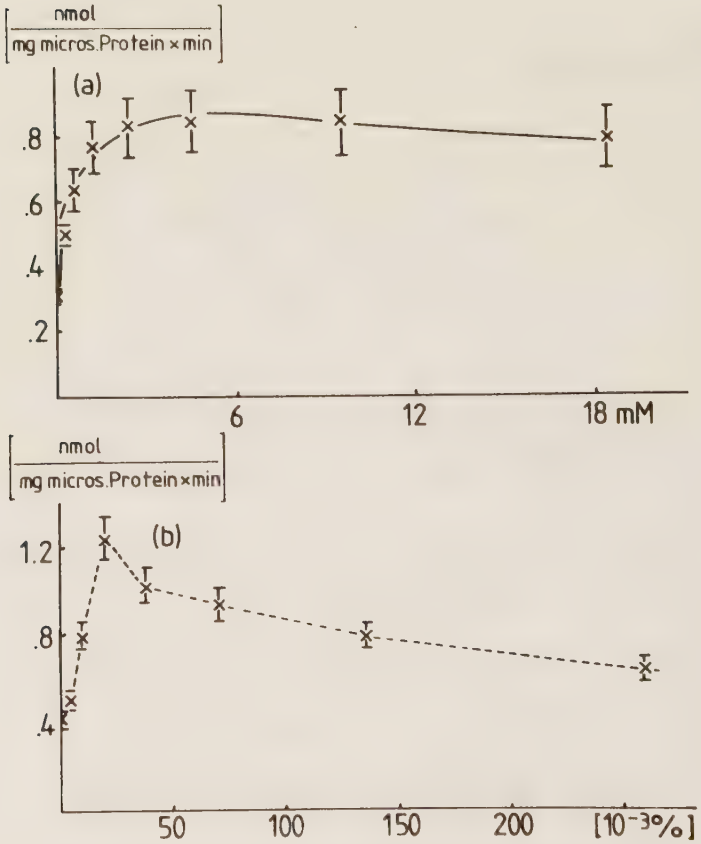
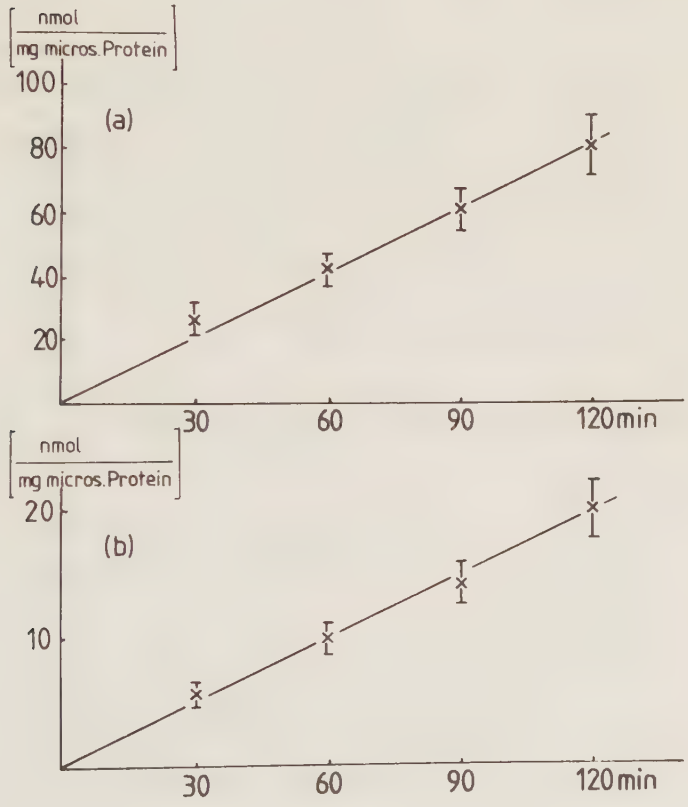


Abbildung 20

Zeitabhängigkeit der Bilirubin-UDP-GT bei Microsomen von (a) Ratte und (b) Mensch



4-fache Steigerung der Enzymaktivität beobachtet werden (Abbildungen 18b und 19b). Alle Enzymbestimmungen wurden mit einer Endkonzentration von 0.028 o/o durchgeführt.

3.1.3 Untersuchungen zur Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase

Bei allen Messungen wurden die unter „ Methoden " angegebenen Bedingungen konstant gehalten, nur die jeweils zu prüfende Variable wurde geändert. Diese Experimente mußten im abgedunkelten Raum durchgeführt werden, da alle Lösungen mit Bilirubin oder seinen Konjugaten bei Tageslicht nicht stabil sind. Wiederum kamen nur vollaktivierte Mikrosomen zur Verwendung.

3.1.3.1 Zeitabhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase

Die absolute Aktivität der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase ist im Vergleich zu den anderen Formen recht gering.
Die Adaptierung der Methode ist daher zunächst besonders problematisch. Für die Untersuchungen wurden entweder 12 ug mikrosomales Protein aus Rattenleber oder 27 ug aus menschlichen Lebern pro Ansatz verwendet. Bis zur einer Zeitspanne von mindestens 120 min ließ sich ein linearer Kurvenverlauf nachweisen, das gilt sowohl für Rattenlebermikrosomen als auch für Lebermikrosomen vom Menschen unabhängig von der unterschiedlichen Aktivität der beiden

Abbildung 21

Proteinabhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase bei Microsomen von (a) Ratte und (b) Mensch

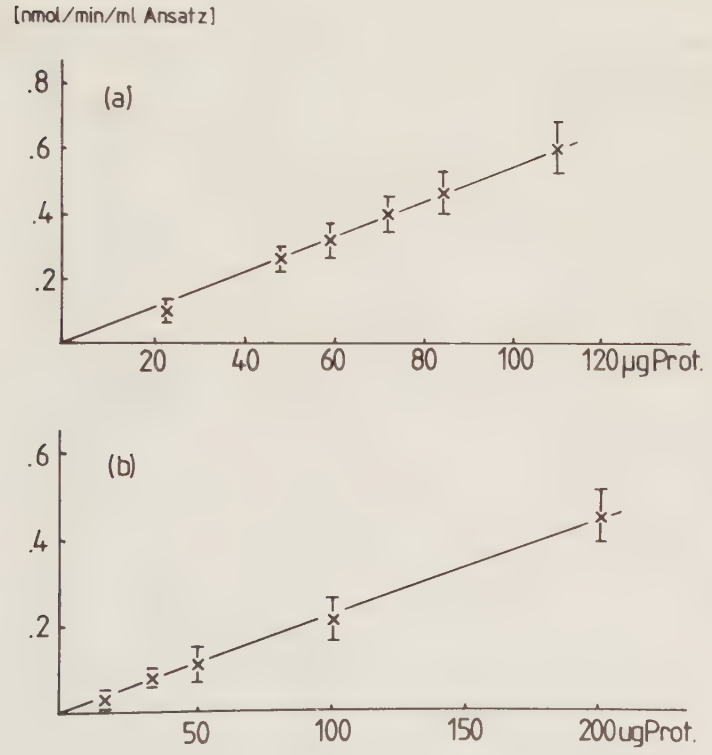


Abbildung 22

Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase von der UDPGA-Konzentration bei Ratten, (a) linear (b) doppelt reziprok

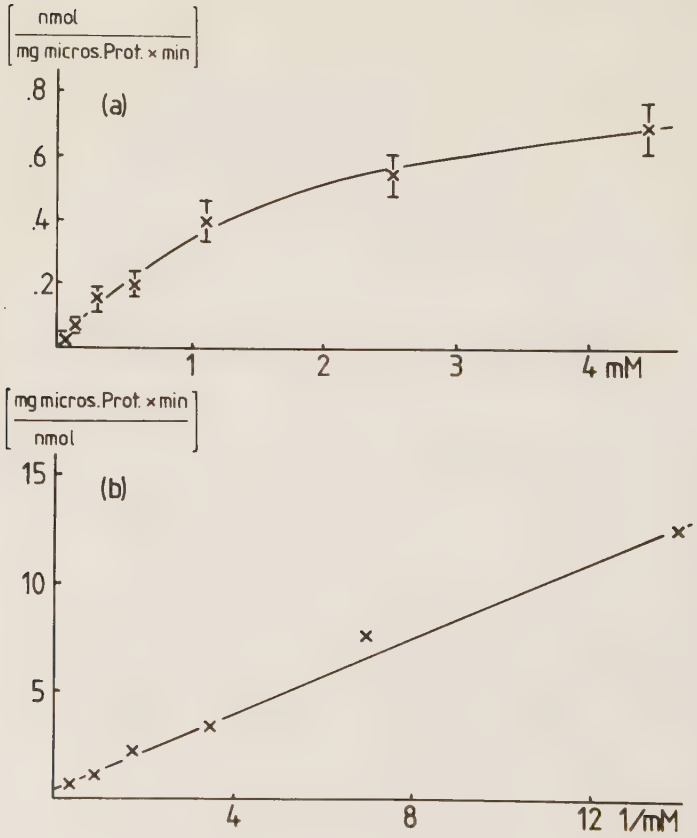
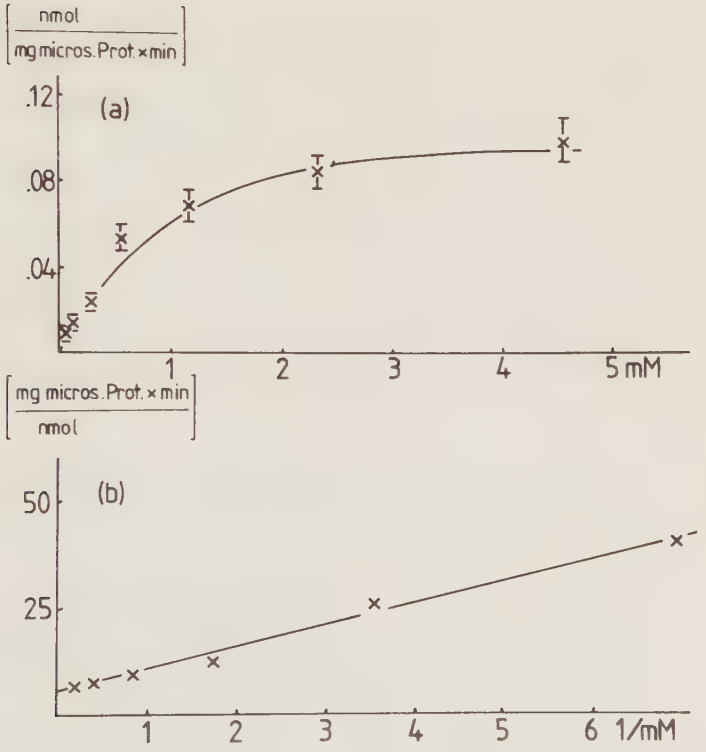


Abbildung 23

Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase von der UDPGA-Konzentration bei Menschen, (a) linear (b) doppelt reziprok



Spezies. Bei allen weiteren Untersuchungen mit menschlichem Lebermaterial wurden Inkubationszeiten von bis zu 120 min angewendet (Abbildungen 20a und 20b).

3.1.3.2 Proteinabhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase

Die Ergebnisse (Abbildungen 21a und 21b) sprechen für einen linearen Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und der Reaktionsgeschwindigkeit sowohl bei der Ratte (bis zu einer Menge von 120 ug) als auch beim Menschen (bis 200 ug). Alle späteren Messungen mit menschlichen Mikrosomen konnten mit ca. 50 ug mikrosomalem Protein pro Ansatz durchgeführt werden, die Bestimmungen mit Rattenmikrosomen benötigten wegen der größen Aktivität nur ca. 15 ug Protein pro Ansatz.

3.1.3.3 Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase von der UDPGA-Konzentration

Diese Beziehung ist in den Abbildungen 22a und 23a im linearen Maßstab dargestellt. Die Berechnung der scheinbaren K_M-Werte erfolgte nach Auftragung der Meßergebnisse im doppelt reziproken Verfahren (Lineweaver-Burk-plot). (Abbildungen 22b und 23b, Tabelle 2).

3.1.3.4 Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase von der Bilirubin-Konzentration

Bei konstanter Konzentration von UDPGA wurde die Abhängigkeit der Glucuronyltransferase von der Bi-

Abbildung 24

Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase von der Bilirubin-Konzentration bei Ratten, (a) linear (b) doppelt reziprok

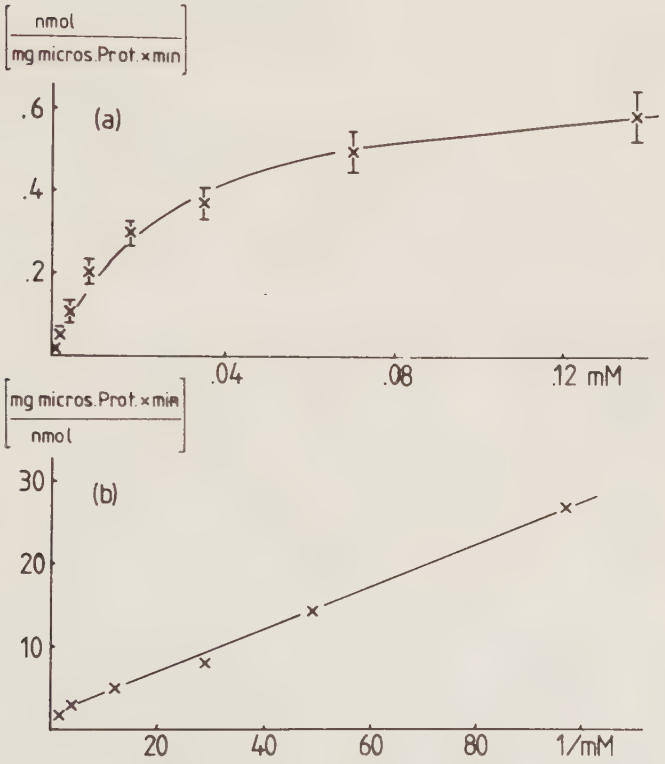
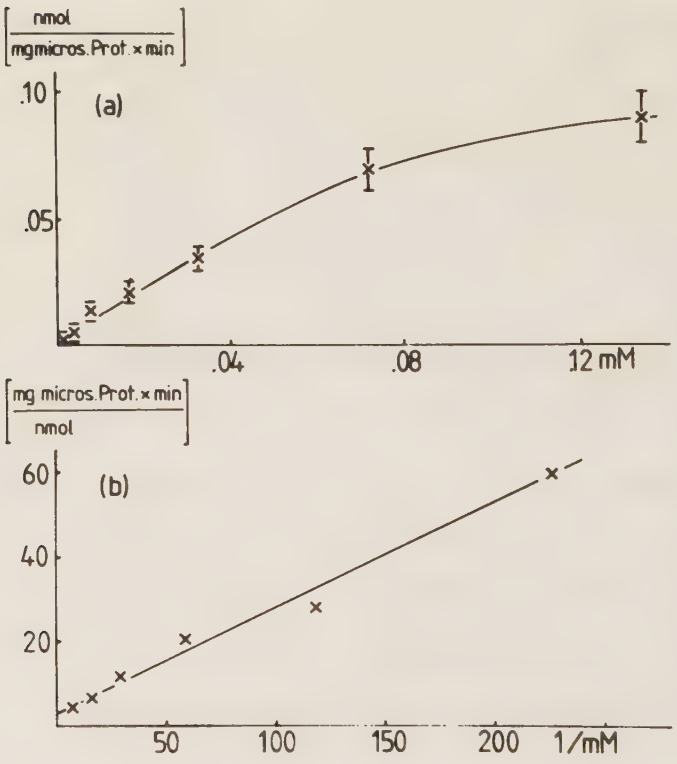


Abbildung 25

Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase von der Bilirubin-Konzentration bei Mensch, (a) linear (b) doppelt reziprok



lirubin-Konzentration untersucht. Es muß ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß in diesem Ansatz Bilirubin teilweise an Albumin gebunden war. Dieser Bilirubin-Albumin-Komplex ist nicht als Substrat der Glucuronyltransferase anzusehen, sondern nur das freie, in löslicher Form vorliegende Bilirubin kann mit dem Enzym reagieren (127) (Abbildungen 24a/b und 25a/b, Tabelle 2).

3.1.3.5 Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase von der Mg^{++}-Konzentration

Bei der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase beobachtete man besonders mit Rattenmikrosomen eine außerordentlich ausgeprägte Zunahme der Aktivität, die bei diesen Messungen das 16-Fache des Ausgangswertes erreichte. Die optimale Mg^{++}-Konzentration lag hier zwischen 4 bis 8 mM. Bei Verwendung menschlichen Materials konnte eine Aktivierung auf das 5-Fache erzielt werden. Für alle weiteren Untersuchungen wurde eine Konzentration von 8 mM gewählt (Abbildungen 26a und 27a).

3.1.3.6 Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase von der Bij 58-Konzentration

In einigen Arbeiten der Literatur wurde ein Aktivierungseffekt der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase durch ein Detergens verneint (8, 124), dennoch konnte ein solcher festgestellt werden. Bei einer Konzentration von 0.027 o/o trat eine Steigerung der Aktivität um das 3-Fache sowohl bei

Abbildung 26

Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase bei Ratten von der (a) Mg^{++}- und (b) Brij 58-Konzentration

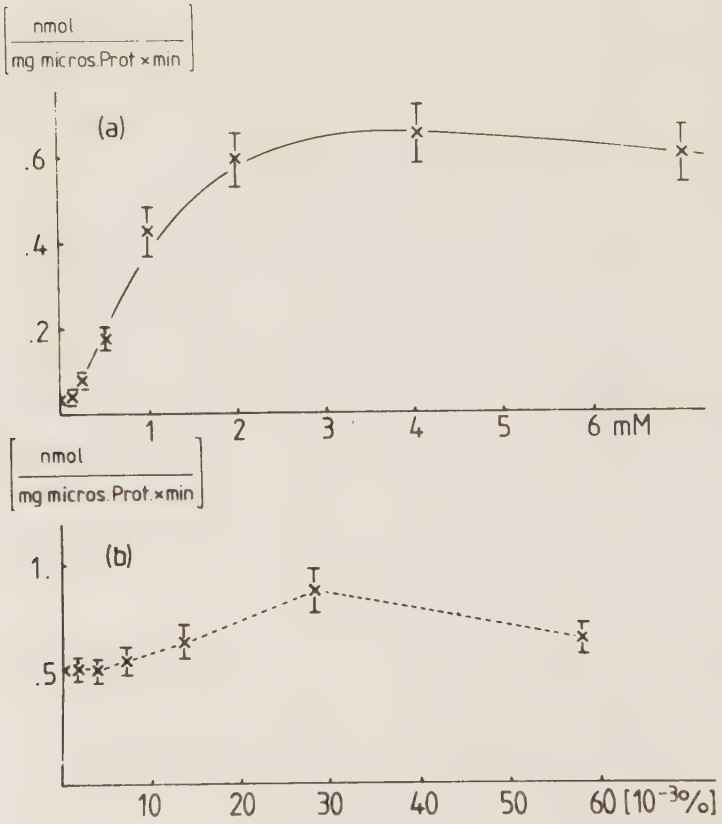


Abbildung 27

Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase bei Menschen von der (a) Mg^{++}- und (b) Brij 58-Konzentration

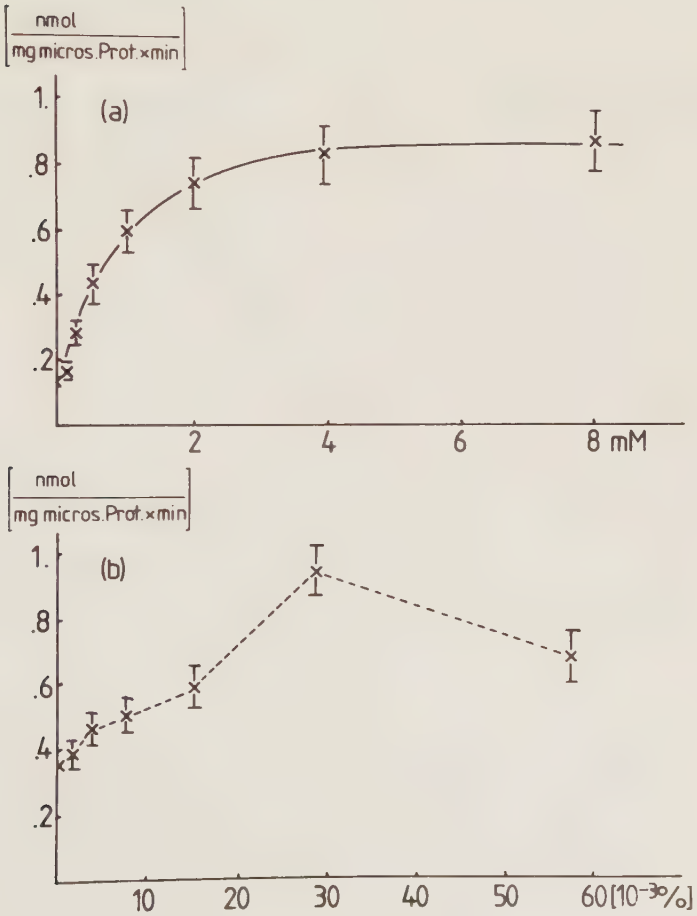
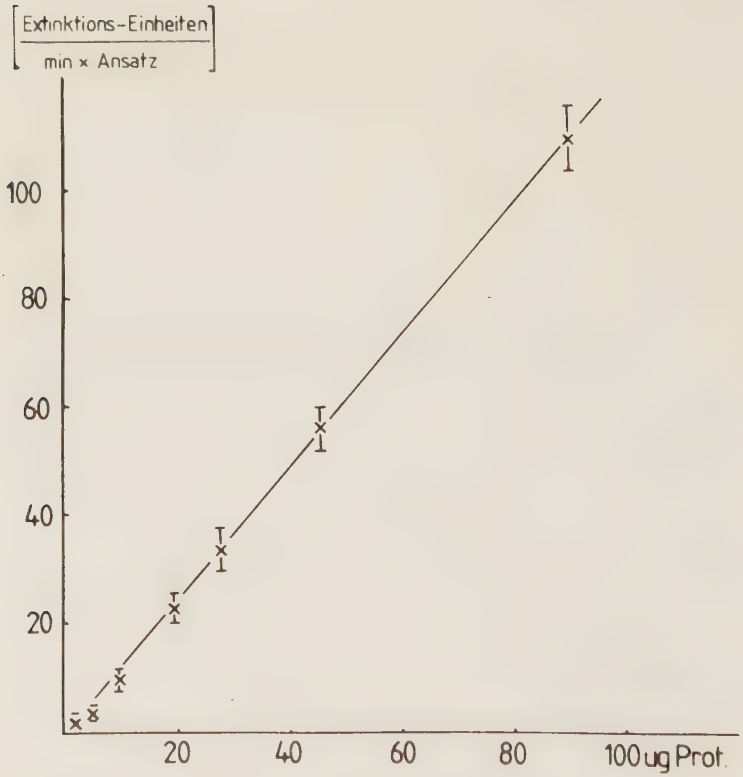


Abbildung 28

Proteinabhängigkeit der p-Nitrophenol-UDP-Glucuronyltransferase bei der Ratte



sowohl bei Verwendung menschlicher als auch Rattenlebermikrosomen auf. (Abbildungen 26b und 27b)

3.1.3.7 Abhängigkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase ((vollaktivierte Form)) von der UDPNAcG-Konzentration

Frühere Untersuchungen (23, 24, 192, 160) ergaben, daß UDPNAcG, das physiologischerweise in der Leber anzutreffen ist, die Aktivität der Glucuronyltransferase steigert. Dieser Effekt soll an die intakte Phospholipidumgebung des Enzyms gebunden sein, woraus geschlossen wird, daß UDPNAcG ein physiologischer Aktivator der Glucuronyltransferase ist. Wenn diese Lipidumgebung des Enzyms zerstört wird, übt UDPNAcG keinen Einfluß mehr auf die Enzymaktivität aus. Es wurde nachgeprüft, ob diese Feststellung auch auf das Detergens Brij 58 zutrifft. Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß das UDPNAcG für Brij 58 voll aktivierte Mikrosomenpräparationen keinen induzierenden Einfluß besitzt, sondern in höheren Konzentrationen sogar als Inhibitor in Erscheinung tritt.

3.1.4 Untersuchungen zur p-Nitrophenol-UDP-Glucuronyltransferase

Da ausführliche Untersuchungen von Rexer (145) zu diesem Enzym vorliegen, wurde bis auf die Proteinabhängigkeit auf eine weitere Charakterisierung an dieser Stelle verzichtet.

3.1.4.1 Proteinabhängigkeit der p-Nitrophenol-UDP-Glucuronyltransferase

Bei der Ratte konnte eine lineare Abhängigkeit zwischen der Enzymkonzentration und der Reaktionsgeschwindigkeit bis zu einer Menge von 90 ug mikrosomales Protein nachgewiesen werden (Abbildung 28).

3.1.4.2 Zeitabhängigkeit der p-Nitrophenol-UDP-Glucuronyltransferase

Bei dieser kontinuierlichen Enzymbestimmungsmethode (direkt optischer Test) konnte eine Linearität der Reaktion bis zu 3 min festgestellt werden.

3.2 Empfindlichkeiten der Methoden

3.2.1 Empfindlichkeit der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase

Wegen der hohen Empfindlichkeit radioaktiver Testverfahren wurden für diese Untersuchungen solche Methoden eingesetzt. Gemessen wurde die Aktivität des radioaktiv markierten Produktes, des glucuronidierten 1-Naphthol. Das Verfahren mußte zumindest folgende Bedingungen erfüllen:

- Die Zählrate einer Probe muß mindest doppelt so hoch wie die des Leerwertes sein
- Alle Proben müssen als Doppelbestimmungen gemessen werden.

Tabelle 2

Enzymkinetische Daten für Mikrosomen der Normalgruppe

A. Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase bei der Ratte

V_{max} Einheit : nmol/mg mikrosomales Prot./min

gemessen	Literatur			
	Detergens	Ratte	Wert	Zitat
$103^{+}_{-}32$	Triton X 100	Sprague-Dawley	$56^{+}_{-}22$	43
	Triton X 100	Sprague-Dawley	$64^{+}_{-}15$	30
	Triton X 100	Sprague-Dawley	$86^{+}_{-}18$	35
	Deoxycholat	Sprague-Dawley	$118^{+}_{-}19$	35
	Triton X 100	Charles-River	$53^{+}_{-}12$	108
	Brij 58	Wistar	$75^{+}_{-}15$	38

$K_{M\text{-}Naph.}$ Einheit : mM

gemessen	Literatur			
	Detergens	Ratte	Wert	Zitat
0.200	Triton X 100	Charles-River	0.410	108

$K_{M\text{-}UDPGA}$ Einheit : mM

gemessen	Literatur			
	Detergens	Ratte	Wert	Zitat
0.312	Triton X 100	Charles-River	0.340	108

beim Menschen

V_{max} Einheit : nmol/mg mikrosomales Prot./min

gemessen	Literatur			
	Detergens	Histologie	Wert	Zitat
$10 \pm 3,7$				

$K_{M\text{-Naph.}}$ Einheit : mM

gemessen	Literatur			
	Detergens	Histologie	Wert	Zitat
0.147	Brij 58	normal/Homogenat	0.05	31

$K_{M\text{-UDPGA}}$ Einheit : mM

gemessen	Literatur			
	Detergens	Histologie	Wert	Zitat
0.096	Brij 58	normal/Homogenat	0.5	31

B. Morphin-UDP-Glucuronyltransferase bei der Ratte

V_{max} Einheit : nmol/mg mikrosomales Prot./min

gemessen	Literatur			
	Detergens	Ratte	Wert	Zitat
7.5 ± 1.2	Brij 58	Wistar	7.9 ± 0.6	38
	Bilirubin	Sprague-Dawley	4.2 ± 0.4	152
	Deoxycholat	Sprague-Dawley	2.0 ± 0.4	152

$K_{M\text{-Morph.}}$ Einheit : mM

gemessen	Literatur			
	Detergens	Ratte	Wert	Zitat
0.807	Triton X 100	Sprague-Dawley	3.0	154
	gereinigt	Sprague-Dawley	0.3	171

$K_{M\text{-UDPGA}}$ Einheit : mM

gemessen	Literatur			
	Detergens	Ratte	Wert	Zitat
0.267	Triton X 100	Sprague-Dawley	1.8	154
	gereinigt	Sprague-Dawley	3.5	171

beim Menschen

V_{max} Einheit : nmol/mg mikrosomales Prot./min

gemessen	Literatur			
	Detergens	Histologie	Wert	Zitat
0.6 ± 0.2				

$K_{M\text{-}Morph.}$ Einheit : mM

gemessen	Literatur			
	Detergens	Histologie	Wert	Zitat
0.733				

$K_{M\text{-}UDPGA}$ Einheit : mM

gemessen	Literatur			
	Detergens	Histologie	Wert	Zitat
0.237				

C. Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase bei der Ratte

V_{max} Einheit : nmol/mg mikrosomal. Prot./min

gemessen	Literatur			
	Detergens	Ratte	Wert	Zitat
0.9 ± 0.15	Triton X 100		0.6	35
	Deoxycholat		2.5	35

$K_{M\text{-}Billi.}$ Einheit : mM

gemessen	Literatur			
	Detergens	Ratte	Wert	Zitat
0.016	kein		0.068	134
	Digitonin		0.094	81
	kein	SIV	1.8	104

$K_{M\text{-}UDPGA}$ Einheit :mM

gemessen	Literatur			
	Detergens	Ratte	Wert	Zitat
1.35	kein		2.43	134
	Digitonin		0.385	81
	kein	SIV	1.8	104

beim Menschen

V_{max} Einheit : nmol/mg mikrosomales Prot./min

gemessen	Literatur			
	Detergens	Histologie	Wert	Zitat
0.12 ± 0.01	Digitonin	normal	0.283	69
	kein	normal	0.077	69

$K_{M\text{-Bili.}}$ Einheit : mM

gemessen	Literatur			
	Detergens	Histologie	Wert	Zitat
0.048				

$K_{M\text{-UDPGA}}$ Einheit : mM

gemessen	Literatur			
	Detergens	Histologie	Wert	Zitat
0.599				

Danach läßt sich die untere Nachweisgrenze d. h. die Empfindlichkeit errechnen. Der Leerwert hatte im Durchschnitt eine Zählrate von 180 dpm, was einer umgesetzten Menge von 2.0×10^{-10} mol 1-Naphthol entspricht. Daraus folgt, daß eine Menge von 2 x 0.7 ug mikrosomalem Protein bei der Ratte (entspricht einem Leberfeuchtgewicht von 0.025 mg) und von 2 x 5 ug beim Menschen (entspricht 0.200 mg Leberfeuchtgewicht) für Mikrosomen der Kontrollgruppe ausreichen müßte.

3.2.2 Empfindlichkeit der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase

Der Leerwert hatte in diesem Untersuchungsgang durchschnittlich eine Zählrate von 1400 dpm, was einer Menge von 4.3×10^{-9} mol umgesetzten Morphin entspricht. Daraus ließen sich folgende Mindestmengen mikrosomalen Proteins errechnen, dabei sollten auch in diesen Fällen die oben beschriebenen Bedingungen erfüllt werden. Es wurden demzufolge für Rattenmaterial 2 x 10 ug (entspricht 0.4 mg Leberfeuchtgewicht) und für menschliches Gewebe 2 x 50 ug (entspricht 2 mg Leberfeuchtgewicht) mikrosomales Protein bei den Kontrollgruppen benötigt.

3.2.3 Empfindlichkeit der Bilirubin-UDP-Glucuronyl-transferase

Der Leerwert hatte in diesem Untersuchungsgang einen durchschnittlichen Extinktionswert von 0.05, das bedeutet eine umgesetzte Menge Bilirubin von 1.1×10^{-10} mol, das entsprach bei der Ratte 2 x 8 ug (0.3 mg Leberfeuchtgewicht) und beim Menschen 2 x 50 ug (2 mg Leberfeuchtgewicht) mikrosomalem Protein.

3.3 Tierversuche

3.3.1 Einleitung

Um die Aussagekraft der entwickelten Mikromethoden zu überprüfen, wurden Tierversuche durchgeführt. Daneben wurde die Induktionspotenz einiger Substanzen eruiert, von Pharmaka, einem Cancerogen und einem Insektizid. Zu diesen Tests wurden männliche Ratten vom Typ Wistar mit einem durchschnittlichen Gewicht von 150 g verwendet. Die Mikrosomen wurden in der oben beschriebenen Weise hergestellt.

3.3.2 Versuchsdurchführung und Gruppeneinteilung

N : Normalgruppe =

Die Tiere erhielten 5 Tage lang täglich 2 mal physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal

injiziert und wurden nach 7 Tagen getötet

BP : Benzpyrengruppe

Die Tiere erhielten 3 Tage lang täglich 20 mg Benzo(a)pyren/kg Körpergewicht in sterilem Olivenöl intraperitoneal injiziert und wurden am 5. Tag getötet

DDT : DDT-Gruppe

Die Tiere erhielten eine einmalige Dosis von 1 g Di-(p-chlorphenyl-)beta-trichloraethan/kg Körpergewicht in sterilem Olivenöl intraperitoneal injiziert und wurden dann nach einer Woche getötet

E : Estradurin^{R}-Gruppe

Die Tiere erhielten einmal 1 mg Polyoestradiol intraperitoneal injiziert und wurden nach 4 Wochen getötet

PB : Phenobarbital-Gruppe

Die Tiere erhielten 4 Tage lang täglich 80 mg Phenobarbital/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert und wurden am 5. Tag getötet

Rifa: Rifampicin-Gruppe

Die Tiere erhielten 5 Tage lang täglich 20 mg Rifampicin/kg Körpergewicht durch eine Schlucksonde und wurden nach 2 Tagen getötet

Tabelle 3

Ergebnisse der Tierversuche

N : Kontrollgruppe, BP : Benzpyren-Gruppe, DDT : DDT-Gruppe,

E : Polyoestradiol-Gruppe, PB : Phenobarbital-Gruppe,

Rifa : Rifampicin-Gruppe, TSO : trans-Stilbenoxid-Gruppe

Einheit: nmol/mg mikrosomales Protein/min

Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase

Gruppe	n	$\bar{x}$	S_D	p<	o/o von $\bar{x}_N$
N	6	103.0	31.6	-	-
BP	5	186.7	21.3	0.0005	181
DDT	6	131.7	21.3	0.05	128
E	6	48.7	5.2	0.0025	47
PB	6	151.5	47.3	0.05	147
Rifa	5	119.6	23.9	0.2	116
TSO	5	185.9	54.1	0.01	180

Morphin-UDP-Glucuronyltransferase

Gruppe	n	$\bar{x}$	S_D	p<	o/o von $\bar{x}_N$
N	5	5.28	1.23	-	-
BP	5	8.74	0.93	0.0005	166
DDT	5	8.69	3.06	0.05	165
E	5	5.26	2.91	0.495	99
PB	5	16.82	4.76	0.0005	319
Rifa	5	8.20	1.80	0.01	155
TSO	5	26.37	10.84	0.0025	499

Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase

Gruppe	n	$\bar{x}$	S_D	p<	o/o von $\bar{x}_N$
N	5	0.694	0.154	-	-
BP	5	1.452	0.953	0.1	209
DDT	5	0.849	0.270	0.15	122
E	5	0.655	0.101	0.35	94
PB	5	1.315	0.192	0.0005	189
Rifa	5	1.240	0.261	0.0025	179
TSO	5	1.222	0.223	0.0025	176

TSO : trans-Stilben-oxid-Gruppe
Die Tiere erhielten 6 Tage lang 400 mg trans-Stilben-oxid/kg Körpergewicht intraperitoneal in sterilem Sonnenblumenöl injiziert und wurden 24 Stunden nach der letzten Injektion getötet.

3.3.3 Ergebnisse der Tierversuche
(Abbildungen 29a/b/c und Tabelle 3)

Die Ergebnisse entsprachen vergleichbaren Untersuchungen in der Literatur.
Als neue Erkenntnisse kamen dazu, daß 3,4-Benzpyren sich als ein Induktor der Form I der UDP-Glucuronyltransferase erweist, während Polyoestradiol ein Inhibitor dieser Form sein könnte. Auch lassen sich durch diese Induktionsversuche bei der Ratte die Morphin-konjugierende Form II A und die Bilirubin-konjugierende Form II B trennen, eine Feststellung, die die oben aufgestellte Hypothese, die Existenz dreier UDP-Glucuronyltransferasen, stützt. Rifampicin steigert selektiv im Rattenversuch die Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase, dagegen hat trans-Stilbenoxid einen herausragenden Effekt auf die Morphin-Konjugation.
Nach diesen einführenden Untersuchungen kann man davon ausgehen, daß die Hypothese der drei Formen der UDP-Glucuronyltransferasen wahrscheinlich ist, deshalb wurden auch bei den menschlichen Gewebeproben, soweit möglich, alle drei Formen bestimmt.

3.4 Ergebnisse der Untersuchungen an menschlichen Lebermikrosomen

3.4.1 Einleitung

Da für die Untersuchung der drei Formen der UDP-Glucuronyltransferase in menschlichen Lebermikrosomen unterschiedliche Mengen an Material zur Verfügung standen, konnten nicht in allen Fällen die Aktivitäten sowohl der Naphthol- als auch der Morphin- und der Bilirubin-konjugierenden Form bestimmt werden. Daneben wurde auch in einigen Fällen noch die Aktivität der p-Nitrophenol-UDP-Glucuronyltransferase gemessen.

3.4.2 Aktivitätsunterschiede zwischen bioptischen und Exzisionsmaterial (Tabelle 4)

Grundlage für alle weiteren Untersuchungen war der Nachweis gleicher Enzymaktivitäten in Mikrosomen aus unterschiedlich gewonnenem Probenmaterial. Für die Berechnung der Mittelwerte wurden die Einzelwerte alle Proben herangezogen, eine Auftrennung in verschiedene Gruppen erfolgte nicht. Die beiden Kollektive waren nicht signifikant verschieden.

Tabelle 4

Enzymaktivitäten bei unterschiedlich gewonnenem Probenmaterial (in nmol/mg mikro. Protein x min)

Aglykon	Biopsie			Exzision		
	$\bar{x}$	s_D	n	$\bar{x}$	s_D	n
Naphthol	20.14	10.9	85	17.84	13.46	106
Morphin	0.97	0.73	15	0.98	0.64	62
Bilirubin	0.42	0.35	13	0.77	0.98	59

3.4.3 Korrelation zwischen den einzelnen Formen der UDP-Glucuronyltransferase

Es lag nahe, die Ergebnisse der UDP-Glucuronyltransferasen, falls mehrere Formen von einer Gewebeprobe untersucht worden waren, ihre Abhängigkeit von einander zu bestimmen. Außer zwischen der Naphthol- und der p-Nitrophenol-konjugierenden Form (31) war keine enge Korrelation festzustellen (Abbildung 30, Tabelle 5)

Tabelle 5

Korrelation zwischen den unterschiedlichen UDP-Glucuronyltransferasen

Aglykon	p-Nitrophenol		Morphin		Bilirubin	
	n	r	n	r	n	r
Naphthol	29	0.89	73	0.28	72	0.34
Morphin	-	-	-	-	63	0.01

Auch diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese von der Existenz dreier UDP-Glucuronyltransferasen im menschlichen Organismus, auch wenn sie keine endgültigen Beweise für die Heterogenität des Enzyms darstellen.

3.4.4 Altersabhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferasen

Bevor die Patienten in Diagnosegrupppen eingeteilt wurden, mußte nachgeprüft werden, ob zwischen dem Alter des Patienten und der gemessenen Enzymaktivität ein Zusammenhang besteht. Dazu wurden alle Patienten, die keine induzierenden Pharmaka erhalten hatten, getrennt nach dem Geschlecht auf eine Korrelation zwischen Alter und gemessener Aktivität überprüft. Dabei ließ sich keine Abhängigkeit zwischen den beiden Variablen ermitteln. Das gilt sowohl für die lineare, als auch exponentielle oder logarithmische Funktion (Tabelle 6). Auch bei der Einteilung der Patienten in Altersgruppen konnte keine Altersabhängigkeit nachgewiesen werden, aufgrund der dargestellten Testergebnisse wurde in Zukunft davon ausgegangen, daß keine Altersabhängigkeit der Enzymaktivität besteht.

3.4.5 Geschlechtsabhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferasen

Tabelle 6 zeigte auch, daß mit einer geschlechtsabhängigen Variation der Enzymaktivität nicht gerechnet werden mußte. Deutlich wird dies auch bei der Analyse der Daten in Bezug auf die Rauchgewohnheiten der Patienten (Tabelle 7).

Tabelle 6

Altersabhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferasen (lineare Funktion)

	Alter in Jahren	Aktivität nmol/mg Prot/min	r
Naphthol-UDPGA			
Frauen	52.53 ± 17.12	16.56 ± 8.31	0.021
Männer	49.49 ± 15.02	17.94 ± 8.18	0.077
Morphin-UDPGA			
Frauen	53.08 ± 17.58	1.05 ± 0.71	0.006
Männer	53.60 ± 15.34	0.94 ± 0.64	0.033
Bilirubin-UDPGA			
Frauen	53.87 ± 17.39	0.335 ± 0.32	0.165
Männer	55.28 ± 15.28	0.673 ± 1.15	0.217

3.4.6 Abhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferasen von den Rauchgewohnheiten

Im Tierversuch erwies sich das 3,4-Benzpyren als ein effektiver Induktor der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase. Es ist seit langem bekannt, daß auch im Zigarettenrauch Benzpyrene nachzuwiesen sind. Man kann nun diesen Naturversuch verwenden, um nachzuprüfen, ob sich bei den vorliegenden Daten eine Induktion durch das Zigarettenrauchen nachweisen läßt. Es wurden alle Patienten hinzugezogen, die unter keiner Therapie eines als Induktor bekannten Pharmakons standen und höchstens geringe Mengen Alkoho

zu sich nahmen, was aus anamnestischen Angaben und der Kontrolle der Routinelabordaten neben der Leberhistologie hervorging.
Alle diese Patienten wurden in vier Gruppen eingeteilt:

- männliche und weibliche Raucher (mehr als 10 Zigaretten pro Tag)
- männliche und weibliche Nichtraucher

Alle vier Kollektive hatten in Hinsicht auf die histologischen Bilder der Leber eine vergleichbare Zusammensetzung: nicht-alkoholische Leberzellverfettung, chronisch rezidivierende Pericholangitis und Pericholangiolitis, chronische gering aktive Hepatits, gering veränderte oder normale Histologie. (Die Altersverteilung war bei den Gruppen der Nichtraucher um 10 Jahre höher angesiedelt, dies konnte ausgeglichen werden, wenn alle Patienten älter als 60 Jahre nicht berücksichtigt wurden, das Ergebnis änderte sich dadurch nicht). Zwischen den Geschlechtern zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Dagegen konnte festgestellt werden, daß nur bei der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase die Enzymaktivität trotz der Inhomogenität der Gruppen bei den Rauchern zwischen 25 o/o (Männer) und 51 o/o (Frauen) höher war als in den jeweiligen Kontrollgruppen der Nichtraucher.

Tabelle 7

Abhängigkeit vom Rauchen (mehr als 10 Zigaretten pro Tag)

Einheit (nmol/mg mikrosomales Protein/min)

Aglykon	Raucher			Nicht-Raucher			p
Geschlecht	n	$\bar{x}$	s_D	n	$\bar{x}$	s_D	<
Naphthol							
Frauen	12	21.50	9.19	36	14.25	7.33	0.0005
Männer	18	20.56	9.00	13	16.32	6.60	0.05
beide	30	20.88	8.88	49	14.59	6.93	0.0005
Morphin							
Frauen	5	0.90	0.35	19	0.90	0.56	
Männer	6	1.37	0.83 x	7	1.03	0.75	0.2
beide	11	1.13	0.65	26	0.93	0.60	0.1
Bilirubin							
Frauen	6	0.28	0.14	18	0.42	0.38	0.05
Männer	5	0.75	0.84 xx	6	0.38	0.43	0.2
beide	11	0.49	0.59	24	0.41	0.37	0.2

Unterschied zwischen den Geschlechtern :

x = $p < 0.1$ xx : $p < 0.1$

3.4.7 Einteilung der Patienten in Diagnosegruppen

Die Einteilung der Patienten erfolgte aufgrund zweier Hauptkriterien:

1. endogene Einflüsse : Erkrankungen, Leberhistologie, Routinelabordaten
2. exogene Einflüsse : Alkoholgenuß, induzierende Medikamente

3.4.7.1 Patienten mit normaler Leberhistologie

Die Patienten, deren Lebergewebe keine histologischen Veränderungen zeigten und die keine induzierenden Pharmaka erhalten hatten, wurden in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt

- Die Normalgruppe (NO)
- Die Gruppe der Träger gastointestinaler Karzinome (NC)
- Die Gruppe der Gallensteinträger (NL)

3.4.7.1.1 Die Normalgruppe (NO)

In die Normalgruppe (NO) wurden Patienten eingeordnet, die neben normaler Leberhistologie keine von der Norm abweichenden Routinelabordaten zeigten, keine induzierenden Medikamente zu sich nahmen und darüber hinaus an keinem Karzinom des Gastrointestinaltraktes litten (Tabellen 8 und 10). In dieser Gruppe fielen folgende Erkrankungen: M. Hodgin, Non-Hodgkin-Lymphome und hämatologische Erkrankungen ohne Leberinfiltration, Magenulcera. Keinen Unterschied innerhalb dieser Gruppe zeigte die Naphthol-UDP-GLucuronyltransferase in Hinsicht auf die verschiedenen Arten der Probengewinnung, das heißt Nadelblindpunktion oder laparotomische Keilexzision, oder auf das Geschlecht. (Abbildung 31).

3.4.7.1.2 Patienten mit Karzinomen im Gastrointestinaltrakt (NC)

Der einzige Unterschied zur Kontrollgruppe war, daß die Patienten an einem Karzinom des Intestinaltraktes erkrankt waren, zumeist im Bereich des Magens. In diesen Fällen wurde besonders auf den Alkoholgenuß geachtet und zusätzlich der Faktor gamma-GT/SGPT betrachtet (Abbildung 31, Tabellen 8 und 10).

3.4.7.1.3 Patienten mit Cholelithiasis und ohne Leberveränderungen (NL)(Tabellen 8 und 10, Abbildung 31)

Aus den Patienten, die sich einer Cholecystektomie unterzogen und von denen eine Leberkeilexzision zur Verfügung stand, ließ sich eine Gruppe zusammenstellen, die dieselben Bedingungen wie die Normalgruppe erfüllte.

3.4.7.2 Patienten mit pathologisch veränderter Leberhistologie

In der Literatur existieren einige Angaben über die Veränderungen der Enzymaktivität der UDP-Glucuronyltransferasen, meist der Bilirubin-konjugierenden Form, mit den pathologischen Abweichungen der Leber.
Ein Ziel dieser Arbeit war es nun, auch zu untersuchen, wie sich eine pathologische Leberhistologie auf das Spektrum der UDP-Glucuronyltransferasen auswirkt. Dazu wurden diejenigen Patienten, die keine bekannt induzierenden Pharmaka erhielten, aufgrund

der histologischen Diagnosen in verschiedenen Gruppen eingeteilt, Trinker wurden ebenso aussortiert.

3.4.7.2.1 Patienten mit geringgradiger Leberepithelverfettung (FG)

In dieser Gruppe fanden sich alle Patienten, deren Lebern geringgradige Leberepithelverfettung zeigten, ohne daß ein Alkoholabusus bestand. Die Routinelabordaten waren zum Teil unverändert, zum Teil zeigten sie geringe Abweichungen, ohne daß sich dieses Faktum in den Ergebnissen der Enzymbestimmung bemerkbar gemacht hätte. Es handelte sich um folgende Diagnosen:

Tabelle 8 Routinelaborwerte der einzelnen Patiengruppen

Gruppen	Alter in Jahren±s	Bilirubin gesamt von	bis	SGOT von	bis	SGPT von	bis	LAP von	bis	AP von	bis	gammaGT von	bis	Cholesterin-esterase von	bis	gammaGlobulin von	bis	Albumin von	bis	Quick von	bis
NO	42,5±14,4	0,4	1,2	4	17	5	12	18	31	87	255	9	27	2,8	7,6	10	26	4,5	5,5	88	100
NC	71,1± 9,7	0,3	1,8	3	16	2	11	—	—	96	138	6	28	—	—	—	—	—	—	100	100
NL	46,5±13,4	0,3	1,1	6	30	7	15	—	—	58	160	12	31	—	—	—	—	—	—	86	100
FG	60,7±15,5	0,5	3,4	4	120	4	161	—	—	42	518	14	124	—	—	—	—	—	—	65	100
FM	58,3±11,4	0,4	1,4	8	32	8	41	—	—	83	386	8	154	—	—	—	—	—	—	78	100
FS	52,5±21,9	0,5	0,6	10	28	10	29	—	—	162	325	42	115	—	—	—	—	—	—	98	100
GM	34,8± 9,5	0,5	1,1	9	46	9	155	14	40	81	232	5	47	3,3	5,4	6	32,3	3,9	5,8	84	100
CH	42,6±12,0	0,5	2,3	11	465	12	464	20	325	100	335	6	368	—	—	18,5	23,5	4,8	5,6	81	100
ZN	52,3±15,5	0,8	3,2	13	99	14	127	21	46	130	303	30	320	2,4	2,9	25,5	31,5	3,3	4,0	53	100
MB	44,3±20,7	0,7	1,5	12	26	16	29	34	65	188	398	48	169	—	—	23,1	32,9	3,7	6,3	—	—
PO	53,0±15,6	0,3	2,1	5	34	4	53	—	—	62	329	8	196	—	—	—	—	—	—	100	100
PF	58,3±14,2	0,4	1,5	6	58	5	155	22	105	93	1634	12	440	—	—	—	—	—	—	48	100
Einheiten	Jahre	mg/dl		IU/l		IU/l		IU/l		IU/l		IE/l		KIE/l		rel%		g/dl		%	

Tabelle 8 Routinelaborwerte der einzelnen Patientengruppen

Gruppen	Alter in Jahren±s	Bilirubin gesamt von	bis	SGOT von	bis	SGPT von	bis	LAP von	bis	AP von	bis	gammaGT von	bis	Cholesterinesterase von	bis	gammaGlobulin von	bis	Albumin von	bis	Quick von	bis
IS	65 ± 7,0	0,4	1,4	8	12	6	13	19	29	137	221	34	34	—	—	3,2	18,7	5,1	5,5	92	100
RN	38,6±12,8	0,2	0,7	7	26	7	50	14	99	87	143	5	64	4,0	9,7	—	—	—	—	—	—
RH	48,6±11,4	0,4	2,7	14	618	16	499	16	88	88	220	30	131	4,2	4,9	—	—	2,9	4,1	—	—
E	65 ±13,2	—	—	6	38	2	31	—	—	116	1802	23	145	—	—	—	—	—	—	100	100
S	55 ±12,4	0,5	5,0	9	97	9	54	13	149	167	925	14	950	—	—	7,3	20,1	3,7	6,0	73	100
C1	41 ±17,7	1,0	30,8	19	131	33	197	29	148	100	772	33	696	2,9	5,0	16,5	24,0	3,3	5,7	54	100
C2	66,7± 8,4	0,3	3,1	6	67	2	130	23	39	23	138	9	71	—	—	7,1	15,0	—	—	90	100
O	38,8±19,1	0,2	0,3	9	12	9	13	—	—	94	152	8	34	—	—	—	—	—	—	100	100
ZA	52,7±11,6	0,6	1,6	14	59	8	42	21	95	133	489	73	143	1,4	6,4	11,9	31,5	2,1	6,0	45	100
FA	44 ±11	0,4	2,8	16	87	7	48	28	121	73	480	46	438	3,5	6,9	11,9	24,4	2,0	5,7	86	100
Einheiten	Jahre	mg/dl		IU/l		IU/l		IU/l		IU/l		IE/l		KIE/l		rel%		g/dl		%	

Cholelithiasis, unklare Polyposis des Colon, Non-Hodgkin-Lymphome und Karzinome des Gastrointestinaltraktes (Tabellen 8 und 10, Abbildung 31).

3.4.7.2.2 Patienten mit mittelschwerer Leberepithelverfettung (FM)

Im Gegensatz zur vorangegangenen Gruppe wurden die histologischen Veränderungen in diesen Fällen als mittelschwere Verfettung angesehen, die Genese dieser Störungen war verschieden: Ulcus ventriculi, chronische Hepatitis, in vielen Fällen Cholelithiasis, Alkoholabusus wurde ausgeschlossen (Tabellen 8 und 10, Abbildung 31).

3.4.7.2.3 Patienten mit schwerer Leberepithelverfettung (FS)

Daneben kamen noch zwei Patienten zur Beobachtung mit schwerer diffuser großtropfiger Leberepithelverfettung, die an einer akuten Cholecystitis und an einem M. Hodgkin (IIB) erkrankt waren. (Tabellen 8 und 10, Abbildung 31)

3.4.7.2.4 Patienten mit geringer mesenchymaler Reaktion des Lebergewebes (GM)

Die Leberveränderungen waren bei diesen Patienten sehr geringfügig und bestanden nur in einem geringen Leberparenchymschaden mit leichter mesenchymaler Reaktion bei folgenden Diagnosen: Splenomegalie mit Pleuraerguß (unbekannte Genese), reak-

tive Hepatitis, chronisch rezidivierende Iridocyclitis, M. Hodgkin IV. (Tabellen 8 und 10, Abbildung 32)

3.4.7.2.5 Patienten mit chronischen Hepatitiden (CH)

Zu dieser Gruppe wurden Patienten gerechnet, die an chronischen Hepatitiden litten, die auf dem Boden einer Virushepatitis entstanden waren, aber noch nicht zu einem zirrhotischen Umbau geführt hatten. (Tabellen 8 und 10, Abbildung 32).

3.4.7.2.6 Patienten mit nicht-alkoholischen Leberzirrhosen (ZN)

Bei diesen Patienten lag eine Leberzirrhose vor, die nicht auf dem Boden eines Alkoholabusus entstanden war, sondern zum Teil nach einer chronischen Hepatitis sich entwickelt hatte, zum Teil zusammen mit einem Gallensteinleiden vorlag (Tabellen 8 und 10, Abbildung 32).

3.4.7.2.7 Patienten mit granulomatösen Infiltraten in der Leber (MB)

In diesen Fällen zeigte die Leberhistologie eine granulomatöse Hepatitis auf dem Boden eines Morbus Boeck umgeben von einer unspezifischen reaktiven Hepatitis (Tabellen 8 und 10, Abbildung 32).

3.4.7.2.8 Patienten mit chronisch rezidivierenden Pericholangitiden (PO)

Diese Gruppe wurde aus Patienten zusammengestellt, die eine chronisch rezividierenden Pericholangitis ohne begleitende Leberzellverfettung aufwiesen, als Grunderkrankungen litten sie an folgendem: Cholelithiasis, Magenkarzinom und Pankreopathien (Tabellen 8 und 10, Abbildung 32).

3.4.7.2.9 Patienten mit chronisch rezidivierender Pericholangitis und gleichzeitiger Leberzellverfettung (PF)

Bei diesen Patienten kam zum Befund einer chronisch rezidivierenden Pericholangitis noch eine gering- bis mittelgradige Leberepithelverfettung auf dem Boden einer Cholelithiasis, eines M. Hodgkin oder einer chronischen Pankreatitis (Tabellen 8 und 10, Abbildung 32) hinzu.

3.4.7.2.10 Patienten mit einer Infiltration eines systemischen malignen Prozesses (IS)

Drei Patienten zeigten Infiltrationen eines systemischen malignen Prozesses in Form eines Non-Hodgkin-,

Tabelle 9

1. Diagnose: Zustand nach akuter Pankreatitis Histologie: Gallengangswucherung, portale Fibrose, ausgeprägte Parenchympolymorphie Alter: 41 Jahre, Geschlecht: männlich,

Alkohol: 1/4 l Most und Wein pro Tag
Nikotin: nein
Routinelabordaten: normal
Naphthol-UDP-GT: 13.8 nmol/mg mikros. Prot./min

2. Diagnose: Diabetes mellitus
Histologie: ganz ausgeprägte reaktive unspezifische Hepatitis mit deutlicher Sternzellschwellung
Alter: 71 Jahre, Geschlecht: männlich
Alkohol: nein
Nikotin: nein
Routinelabordaten: SGOT 23, SGPT 32, Albumin 3.3,
Naphthol-UDP-GT : 19.6 nmol/mg mikros. Prot./min
Morphin-UDP-GT : 0.46 nmol/mg mikros. Prot./min
Bilirubin-UDP-GT: 0.68 nmol/mg mikros. Prot./min

3. Diagnose: multiple Leberzysten
Histologie: mißgebildete ektatische Gallengänge, unausgekleidete Zysten
Alter: 66 Jahre, Geschlecht: weiblich
Alkohol: kaum
Nikotin: 10 Zigaretten/d
Routinelabordaten: normal
Naphthol-UDP-GT : 42.4 nmol/mikros. Prot./min
Bilirubin-UDP-GT : 0.22 nmol/mg mikros. Prot./min

4. Diagnose: IgG-kappa-Plasmozytom
Histologie: ausgeprägte Aktivierung des RES, geringe Sklerose, auffallend zahlreiche mehrkernige Lymphknoten

Alter: 58 Jahre, Geschlecht: männlich
Alkohol: nein
Nikotin: 20 Zigaretten:d
Routinelabordaten: gamma-Globuline 25.7 o/o
Naphthol-UDP-GT : 22.2 nmol/mg mikros. Prot./min

5. Diagnose: M. Hodgkin IIIA
Histologie: schwere subakute Stauungsleber
Alter: 47 Jahre, Geschlecht: männlich
Medikation: Nitrazepam
Alkohol: 1/2 l Most
Nikotin: nein
Routinelabordaten: SGOT 35, SGPT 17, LAP 56, AP 178, gamma-GT 163, gamma-Globuline 33.7 o/o
Naphthol-UDP-GT : 6.8 nmol/mg mikros. Prot./min

6. Diagnose: Pleura-Pericarditis
Histologie: subakute Leberstauung, geringgradige herdförmige unsystematische mittel- großtropfige Verfettung mit Sternzellaktivierung
Alter: 51 Jahre, Geschlecht: männlich
Medikamente: Diazepam, Phenylbutazon
Alkohol: nein
Nikotin: 20 Zigaretten:d
Routinelabordaten: normal
Naphthol-UDP-GT : 16.6 nmol/mg mikros. Prot./min

7. Diagnose: unklares Fieber
Histologie: Leberkapselfibrose
Alter: 60 Jahre, Geschlecht: weiblich

Alkohol: nein
Nikotin: nein
Routinelabordaten: normal
Naphthol-UDP-GT: 31.9 nmol/mg mikros. Prot./min

8. Diagnose: Guillain-Barré-Polyneuropathie
Histologie: herdförmige großtropfige Verfettung, geringe unspezifische reaktive Hepatitis
Alter: 44 Jahre, Geschlecht: männlich
Medikamente: Allopurinol
Alkohol: kaum
Nikotin: nein
Routinelabordaten: normal
Naphthol-UDP-GLucuronyltransferase: 21.5 nmol/mg Prot./min

eines Hodgkin-Lymphoms und einer chronisch myeloischen Leukose, trotz dieses pathogenetischen Unterschiedes wurden sie in einer Gruppe zusammengefaßt. (Tabellen 8 und 10).

3.4.7.2.11 Patienten mit verschiedenen anderen Befunden

Eine Anzahl von Befunden ließ sich nicht in eine der aufgeführten Gruppen einteilen, die Ergebnisse der Enzymaktivitätsbestimmung wurde in Tabelle 9 zusammengefaßt.

3.4.7.3 Einfluß von exogenen Faktoren auf die Enzymaktivität der UDP-Glucuronyltransferasen

Es wurde oben schon ausgeführt, daß die Rauchgewohnheiten der Patienten einen Einfluß auf die Enzymakti-

vität der UDP-Glucuronyltransferasen besitzen, im besonderen auf die Naphthol-glucuronidierende Form. Neben diesem Hinweis aus menschlichem Untersuchungsmaterial waren schon Induktionsphänomene im Tierversuch dargestellt worden. Es galt nun nachzuprüfen, inwieweit sich das Beobachtete auch an menschlichem Material nachweisen läßt. Aus diesem Grunde wurde die Aktivität mikrosomaler UDP-Glucuronyltransferasen von Patienten gemessen, die vor der Probenentnahme unter Pharmaka standen, welche aus Tierversuchen oder durch klinische Beobachtungen als Induktoren bekannt waren. Es wurde versucht, diese Induktionspotenz auch im menschlichen Organismus nachzuweisen, zwar gibt es in der Literatur bereits hierfür indirekte Hinweise, aber bis auf die Induktionsphänomene des Phenobarbital liegen noch keine direkten Ergebnisse vor. Bei der Auswertung dieser Ergebnisse wurden die histologischen Veränderungen berücksichtigt.

3.4.7.3.1 Induktionseffekte des Rifampicin

3.4.7.3.1.1 Rifampicin-Patienten mit normaler Leberhistologie (RN

Patienten, die an einer Lungentuberkulose erkrankt waren, wurden Leberblindpunktionen entnommen, um nach tuberkulösen Granulomen im Lebergewebe zu fahnden. In diesen Fällen konnte keine Veränderung des Lebergewebes festgestellt werden, die Routinelabordaten wichen nur gering von der Norm ab. Alle Patienten

standen unter einer tuberkulostatischen Dreifachtherapie. Dabei wurde Rifampicin mit 10 mg/kg Körpergewicht oral (aber nicht mehr als 750 mg) pro Tag verabfolgt. (Tabellen 8 und 10, Abbildung 33)

3.4.7.3.1.2 Rifampicin-Patienten mit Veränderungen der Leberhistologie (RH)

In einer zweiten Gruppe der Patienten fanden sich histologische Veränderungen der Leber, sie reichten von einer geringen Leberzellverfettung, über eine geringgradige chronische Hepatitis bis zu Granulomen mit Epitheloid- und Riesenzellen. Da die vorherigen Untersuchungen gezeigt hatten, daß histologische Leberveränderungen schon per se mit Änderungen der Enzymaktivität einhergehen können, wurden die erhaltenen Ergebnisse nicht nur mit der Normalgruppe, sondern auch mit einer anderen inhomogenen Gruppe verglichen, mit allen Nichtrauchern unabhängig von der Leberhistologie . Dabei zeigte sich eine Abweichung der Ergebnisse und eine Signifikanz von $p < 0.0005$ (Tabellen 8 und 10, Abbildung 33)

3.4.7.3.2 Effekte des Polyoestradiol (E)

Nach Jönsson werden Patienten, die an einem Prostata-Karzinom leiden, mit gegengeschlechtlichen Hormonen behandelt, weil dieser Tumor in vielen Fällen hormonabhängig ist. Diese Therapie erfolgte bei den Patienten, deren Mikrosomen aufgearbeitet wurden, durch eine einmalige monatliche Injektion eines Polyoestradiol-Präparates (Estradurin^{R}). Im Tierversuch

war die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase durch Polyoestradiol in exzessiver Dosierung selektiv supprimiert worden. Es scheint, daß bei dieser Therapie Veränderungen in der Leber im Sinne einer intrahepatischen Cholestase auftreten, was auch in der untersuchten Gruppe der Fall war, daneben fanden sich noch eine unspezifische reaktive Hepatitis mit geringer Leberzellverfettung. (Tabellen 8 und 10, Abbildung 34). Auch in diesen Untersuchungen wurden alle Ergebnisse mit der Nichtrauchergruppe verglichen, wobei bei keinem Enzym eine signifikante Abweichung errechnet werden konnte.

3.4.7.3.3 Effekte des Spironolacton (S)

Aus Untersuchungen an Ratten (160, 161) ist bekannt, daß der Aldosteronantagonist Spironolacton ein potenter Induktor der UDP-Glucuronyltransferase ist. Dieser positive Effekt wurde an einer Gruppe Patienten überprüft, die Spironolacton therapeutisch erhielten. Das Untersuchungsgut war sehr heterogen, nur zwei Patienten hatten keine Leberveränderungen, aber erhöhte Enzymwerte, während in fünf weiteren Fällen eine alkoholtoxische Schädigung vorlag, die allein schon die Werte erhöht haben könnte. So war diese Gruppe zwar zur Normalgruppe verschieden, aber nicht zu den verschiedenen Kollektiven der Alkoholiker (Tabellen 8 und 10, Abbildungen 34).

Tabelle 10

Enzymaktivitäten der verschiedenen Patientengruppen (Erklärung siehe Text)

a) Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase

Gruppe	n	von	bis	$\bar{x}$	s_D	p<
NO	13	3.3	14.4	10.0	3.7	
NC	7	8.2	36.8	23.6	9.8	0.0005
NL	11	7.0	30.5	19.1	8.1	0.0025
FG	19	9.4	32.5	21.3	6.2	0.0005
FM	10	8.6	29.5	15.9	6.9	0.01
FS	2	10.3	11.6	11.0	(0.9)	(0.4)
GM	6	15.9	24.4	19.3	3.1	0.0005
CH	6	8.0	17.3	12.5	4.3	0.2
ZN	7	3.3	20.1	9.2	5.8	0.35
MB	4	8.2	32.4	19.6	11.1	0.005
PO	13	7.9	45.6	18.9	10.8	0.005
PF	9	2.3	23.4	13.3	8.2	0.1
IS	3	9.5	33.9	24.2	12.9	0.4
RN	8	21.3	38.8	30.2	7.2	0.0005
RH	7	18.8	45.3	33.7	10.4	0.0005
E	5	9.2	20.5	15.5	4.2	0.01
S	7	11.6	45.3	21.5	11.9	0.0025
C1	3	4.5	14.2	9.9	4.9	0.49
C2	3	24.8	33.8	29.7	4.5	0.0005
O	4	15.9	23.3	21.8	4.8	0.0005
ZA	7	12.0	33.1	21.5	7.1	0.0005
FA	10	16.6	36.6	27.2	6.9	0.0005

b) Morphin-UDP-Glucuronyltransferase

(in nmol/mg mikros. Prot./min)

Gruppe	n	von	bis	$\bar{x}$	s_D	p<
NO	6	0.311	0.840	0.575	0.199	
NC	3	0.780	2.200	1.660	0.770	0.005
NL	6	0.153	0.810	0.720	0.490	0.2
FG	12	0.154	2.093	1.100	0.540	0.01
FM	6	0.200	2.950	1.120	0.960	0.05
FS	1			0.410		
GM						
CH	2	0.850	1.700	1.280	0.600	(0.0025)
ZN	5	0.260	0.590	0.450	0.180	0.1
MB						
PO	7	0.650	2.540	1.570	0.750	0.005
PF	3	0.189	1.560	0.750	0.719	(0.2)
IS						
RN	1		1.450			
RH						
E	4	0.348	1.898	0.790	0.590	0.2
S	3	0.850	1.980	1.140	0.740	0.1
C1	1		0.585			
C2	1		1.046			
O	3	0.710	1.300	1.005	0.295	0.025
ZA	1		0.502			
FA			0.080			

c) Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase

(in nmol/mg mikros. Prot./min)

Gruppe	n	von	bis	$\bar{x}$	s_D	p<
NO	5	0.096	0.133	0.115	0.014	
NC	3	0.041	0.495	0.237	0.233	0.15
NL	6	0.235	0.842	0.491	0.260	0.005
FG	12	0.080	1.240	0.402	0.375	0.1
FM	5	0.156	0.768	0.290	0.270	0.1
FS	1		0.131			
GM						
CH	2	0.114	0.214	0.161	(0.071)	0.01
MB						
PO	8	0.230	2.000	0.804	0.604	0.02
PF	3	0.209	0.510	0.372	0.151	0.0025
IS						
RN	1		0.636			
RH						
E	4	0.173	0.823	0.539	0.204	0.0025
S	2	0.211	1.124	0.668	0.646	(0.05)
C1	1		0.012			
C2	1		2.110			
O	3	0.043	0.454	0.232	0.207	0.15
ZA	1		0.952			
FA	1		0.098			

3.4.7.3.4 Effekte einer Corticoid-Therapie (C)

Die Patienten wurden mit drei verschiedenen Corticoiden behandelt: Fluocortolon, Prednison und Hydrocortison. Drei Patienten (unter Fluocortolon) waren an einer primär biliären Zirrhose mit ausgeprägter Cholestase (Bilirubin 30.8 mg/100 ml), an einer chronischen Hepatitis mit mittelgradiger Leberparenchymverfettung und an einer primär biliären Zirrhose mit geringer Cholestase (Bilirubin in 3.1 mg/100 ml) erkrankt. Diese Gruppe (C1) zeigte keine signifikante Erhöhung der Naphthol-UDP-GLucuronyltransferase im Vergleich zur Normalgruppe. Drei andere Patienten, mit Prednison bzw. Hydrocortison behandelt, litten unter geringen sinusoidalen Verfettungen bzw. einer subakuten Pericholangitis mit Cholestase (Bilirubin 7.8 mg/100 ml)und hatten erhöhte Werte der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase (30,4 bis 33,8 nmol/mg mikrosomales Protein pro Minute) (C2) (Tabellen 8 und 10, Abbildung 34).

3.4.7.3.5 Oestrogen-haltige Antikonzeptiva (Ovoresta, Neogynon) (O)

Des weiteren kamen vier Frauen zur Untersuchung, die eines der handelsüblichen Antikonzeptiva zu sich nahmen und keine oder unterschiedliche Leberveränderungen aufwiesen wie geringfügige Leberepithelverfettung, Ecchinococcus cysticus und geringe extramedulläre Blutbildung bei Splenomegalie und Kugelzellanämie (Tabellen 8 und 10, Abbildung 34).

3.4.7.3.6 Einzelfälle

Die höchste Enzymaktivität, die für die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase gemessen werden konnte, wurde bei einem Patienten festgestellt, der unter Diphenylhydantoin stand (chronisch persistierende Hepatitis, 72,8 nmol/mg mikrosomales Protein/ min).
Aus Rattenversuchen (72) war bekannt, daß Clofibrat einen induzierenden Einfluß auf die Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase besaß, leider kam nur ein Patient zur Beobachtung, bei dem nur die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase gemessen wurde, die nicht vom Normalwert abwich (13,8 nmol/mg mikrosomales Protein/min).

3.4.7.4 Einfluß des Alkoholabusus auf die Aktivität der UDP-Glucuronyltransferasen

Obwohl Alkoholeinfluß auf die UDP-Glucuronyltransferase noch zu den exogenen Einflüssen zu zählen ist, wurde sein Einfluß gesondert analysiert. Wie bekannt ist, spielt der Alkoholgenuß in der Pathogenese und auch in der Ätiologie vieler Erkrankungen eine große Rolle, besonders bei Lebererkrankungen. Die folgende Zusammenstellung gibt einen kleinen Hinweis auf etwaige biochemische Folgen.

3.4.7.4.1 Alkoholische Leberzirrhose (ZA)

Der Diagnose Alkoholabusus lagen folgende Kriterien zugrunde (es mußten zumindest zwei von ihnen erfüllt sein):

- die anamnestischen Angaben durch den Patienten selbst oder seine Umgebung
- eine Erhöhung des Faktors gamma-GT zu SGPT über einen Wert von 5 (bei pathologischen Werten von gammaGT und SGPT)
- die histologische Diagnose alkoholtoxischer Leberschäden

In allen Fällen fanden sich eindeutige schwere Zeichen einer progredienten Leberzirrhose zum Teil mit Verfettung des Restparenchyms (Tabellen 8 und 9, Abbildung 33). Neben einem Unterschied der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase im Vergleich zur Normalgruppe wich dieses Kollektiv auch signifikant von der Gruppe der nichtalkoholischen Leberzirrhosen (ZN) ab, mit $p < 0.0025$. (Tabellen 8 und 10, Abbildung 33)

3.4.7.4.2 Alkoholische Fettleber (FA)

Dieselben Bedingungen, die oben angeführt waren, mußten auch in diesem Fall erfüllt sein, um hier eingeordnet zu werden. Die Aktivität der Naphthol-UDP-Glucuronyl-transferase scheint sogar gegenüber der nicht-alkoholischen Fettleber (FG) gering erhöht zu sein ($p < 0.025$)(Tabellen 8 und 10, Abbildung 33).

4. Wertung und Interpretation

4.1 Die UDP-Glucuronyltransferasen im Zusammenhang mit anderen Enzymen

Abbildung 1 stellt das System der Reaktionswege dar, in das die mikrosomalen UDP-Glucuronyltransferasen im endoplasmatischen Retikulum eingebunden sind. Ausgehend von der aktivierten Form der Glucuronsäure, der UDPGA, sind zwei verschiedene Reaktionswege möglich. Der eine führt über die Pyrophosphatase unter Abspaltung des Uridinmonophosphat zur Glucuronsäure (89, 140), der andere über die Katalyse der UDP-Glucuronyltrasneferasen zu den entsprechenden ß-Glucuroniden. Diese ß-Glucuronide ihrerseits können mittels der ß-Glucuronidase wieder in ihre Bestandteile, das Aglykon und die Glucuronsäure, zerlegt werden (48, 140). Beide enzymatischen Wege spielen für die vorliegenden Untersuchungen eine bedeutende Rolle, der erste Mechanismus durch den Abbau des zur Verfügung stehenden Coenzyms, was sich im Reaktionsablauf in einer frühzeitigen Abweichung der Zeitfunktion von einer Geraden niederschlagen müßte. Eine Zeitfunktion läuft nur solange linear, solange die Bedingungen der Substratsättigung erfüllt sind (Kinetik nullter Ordnung).

Reaktionen:

(A: Aglykon, UDPGA: Diphosphouridinglucuronsäure, UDP: Diphosphouridin, GA: Glucuronsäure, A-GA: ß-Glucuronid)

1. Glucuronidierung:

$$A + UDPGA \xrightarrow{k_1} A\text{-}GA + UDP$$

2. Pyrophosphatase :

$$UDPGA \xrightarrow{k_2} UDP + GA$$

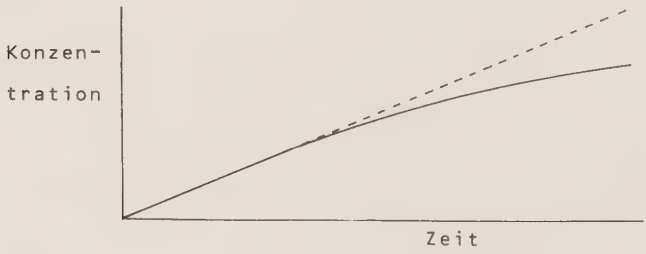
Wenn das Aglykon in seiner Sättigungskonzentration vorliegt, kann man die Kinetik als Summe zweier Parallelreaktionen mit den folgenden Reaktionskonstanten (k_1 und k_2, bei Kinetik 1. Ordnung) auffassen. Daraus ergibt sich für die Zeitabhängigkeit des Produktes der UDP-Glucuronyltransferase eine Gleichung folgender Form:

$$(A\text{-}GA) = \frac{k_1 \times (UDPGA)_o}{k_1 + k_2} \times (1 - e^{-(k_1 + k_2) \times t})$$

mit (A-GA) : Konzentration von ß-Glucuronid

$(UDPGA)_o$: Anfangskonzentration von UDPGA

graphische Darstellung der Funktion:



Das würde bedeuten, daß sich bei den Reaktionsabläufen frühzeitig eine Abweichung der Zeitfunktion

von der Linearität zeigen würde. In keinem der untersuchten Fälle trat dies unter den gegebenen Bedingungen auf. Die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase erwies sich als sowohl bei menschlichen als auch bei tierischen Mikrosomen über einen Zeitraum von mehr als 30 min als linear. Entsprechendes galt auch für die Morphin-UDP-Glucuronyltransferase über einen Zeitraum von 60 min und für die Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase über 120 min. Aus diesen Beobachtungen wird geschlossen, daß die Aktivität der Pyrophosphatase für die Testsituation nicht eine solche Bedeutung besitzt, daß die Konzentrationsminderung des Cosubstrates ein merkliches Ausmaß erreicht. So war von dieser Seite keine Minderung der gemessenen Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber den effektiven Werten zu erwarten.
Daneben muß noch die Auswirkung der ß-Glucuronidase auf die Ergebnisse betrachtet werden, weil dieser Reaktionsschritt als Folgereaktion das Produkt, auf dessen Messung das Bestimmungsprinzip beruht, in seine Bestandteile zerlegt, was sich in einer Verminderung der gemessenen Aktivität bemerkbar macht.

Reaktionen:

1. Glucuronidierung:

$$A + UDPGA \xrightarrow{k_1} A\text{-}GA + UDP$$

2. ß-Glucuronidase :

$$A\text{-}GA \xrightarrow{k_3} A + GA$$

Wenn das Aglykon in seiner Sättigungskonzentration gehalten wird, kann man folgende Gleichung benützen, um den Zeitverlauf der Konzentration des ß-Glucuronids (A-GA) darzustellen :

$$(A\text{-}GA) = \frac{k_1 \times (UDPGA)_o}{k_3 - k_1} \times (e^{-k_1 \times t} - e^{-k_3 \times t})$$

Auch aus dieser Gleichung ergibt sich, daß eine hohe Aktivität des Abbauweges eine Abweichung der Kurve von einer Geraden bewirken würde. Aber nach den eignen Beobachtungen ist dies nicht der Fall. Auch aus der Literatur (48, 140) ist bekannt, daß das pH-Optimum der ß-Glucuronidase im sauren Bereich zu finden ist, beides zusammengenommen bedeutet, daß unter den Untersuchungsbedingungen keine Interferenz der ß-Glucuronidase zu erwarten ist, da k_3 gegen 0 geht.
Nachdem die Zeitabhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferasen untersucht worden ist, kann man mit ausreichender Sicherheit davon ausgehen, daß durch die Meßmethoden die Aktivitäten der UDP-Glucuronyltransferasen so wiedergegeben werden, wie sie sich unter den In-vitro-Bedingungen zeigen.

4.2 Die kinetischen Daten der UDP-Glucuronyltransferasen

Für beide Gruppen, für die menschlichen und die Rattenmikrosomen, wurden Abhängigkeiten der gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten von den beteiligten Substanzen bestimmt. Dabei wurden, wie beschrieben,

nur jeweils die Konzentrationen des zu untersuchenden Substrats variiert, während die übrigen Bedingungen gleich bleiben. Es zeigte sich, daß bei der Abhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferasen von den beiden Substraten keine Unterschiede zwischen den Verhältnissen in den beiden untersuchten Species bestanden, wenn man einen Faktor der Größe 2 vernachlässigt, der in Erscheinung trat. Man kann nun die Ergebnisse dieser Untersuchungen im Sinne eines Lineweaver-Burk-plots aufarbeiten und erhält damit scheinbare Michaelis-Menten-Konstanten (Tabelle 2). Dabei muß man sich aber bewußt sein, daß diese Ergebnisse nicht mit wirklichen Enzymkonstanten verwechselt werden dürfen, weil in diesen Untersuchungen kein gereinigtes Enzym zum Einsatz kam, sondern nur unaufgearbeitete rohe Mikrosomen, einem Gemisch aus verschiedenen Enzymen und Lipoiden, die alle eine Affinität zu den Substraten besitzen können, die sich natürlich in den berechneten Faktoren niederschlagen. Dennoch hat die Berechnung dieser Konstanten einen Sinn, zum einen Mal konnten sie zum Vergleich mit Literaturwerten herangezogen werden - erstaunlicherweise zeigen gereinigte Präparate sehr ähnliche Werte -, darüber hinaus geben sie noch Auskunft, ob man sich mit seiner Methode im Sättigungsbereich der Enzympräparation für die Substratkonzentrationen bewegt, eine Voraussetzung, um die Anfangsgeschwindigkeit zu bestimmen. Bis auf die Morphin-Konzentration konnten diese Bedingungen in allen Messung-

en eingehalten werden. Auch die UDP-Glucuronyl-transferasen zeigen das Phänomen einer Abhängigkeit von der Metallionenkonzentration des Mg^{++}. Dabei konnte eine Aktivierung des Enzyms durch die optimale Mg^{++}-Konzentration bis zum 16-Fachen der Ausgangskonzentration erreicht werden. Höhere Konzentrationen verursachten zum Teil wieder eine Abnahme des Aktivierungseffektes.

Daneben wurden für alle drei Enzymformen die maximalen Aktivierungskonzentrationen des Detergens Brij 58 bestimmt. Aus der Literatur (siehe oben) ist bekannt, daß es viele unkontrollierbare Einflüsse auf die In-vitro-Aktivität gibt. Darunter können auch Substrate fallen und möglicherweise auch Narkotika, denn sie könnten sich gemäß ihrer physikalischen Eigenschaften in die Membran einlagern, was sich in einer Aktivierung bemerkbar machen könnte. Um diese Effekte auszuschalten, wurde die maximale Aktivierbarkeit mit Brij 58 gewählt.

Die Abbildungen (10b, 11b, 18b, 19b, 25b und 26b) beweisen, daß schon geringe Konzentrationen einer membranaktiven Substanz Einflüsse haben. Auch in der Literatur finden sich Hinweise für einen Effekt der halogenierten Kohlenwasserstoffe (36). Die maximal aktivierende Konzentration des Detergens Brij 58 sind im menschlichen und Rattenuntersuchungsmaterial gleich, und (als zweite Feststellung) nicht von der Relation zwischen Detergens und Proteinmenge, sondern allein von der Konzentration des Detergens abhängig. Dies stellt einen Unterschied zu

den Beobachtungen des Detergens Triton X 100 dar, das auch eine geringere Aktivierungspotenz besitzt. (50, 59, 108, 154, 194) Aus diesen Beobachtungen hatte sich gezeigt, daß das Brij 58 für die vorliegenden Untersuchungen das geeignetere Detergens war, denn als erstes besaß es die höchste aktivierende Potenz, und zum zweiten war sein Effekt nur konzentrationsabhängig, was für die Enzymbestimmung wichtig war, weil eine Proteinkonzentration vor dem Meßgang nicht bekannt war. In-vivo könnte das UDPNAcG als Aktivator fungieren, sein Effekt ist in-vitro an eine intakte Lipidumgebung des Enzyms gebunden (192, 193), es war nun offensichtlich, daß nach einer Behandlung mit Brij 58 Mikrosomen diesen Effekt nicht mehr zeigen können, was in der Untersuchung 3.1.3.7 nachgeprüft wurde. Alle diese Nachweise zielten darauf ab, möglichst optimale Bedingungen einzuhalten, um die Empfindlichkeit der Nachweismethode zu vergrößern und Störungen kleinzuhalten.

4.3 Tierversuche (Tabelle 3, Abbildung 29)

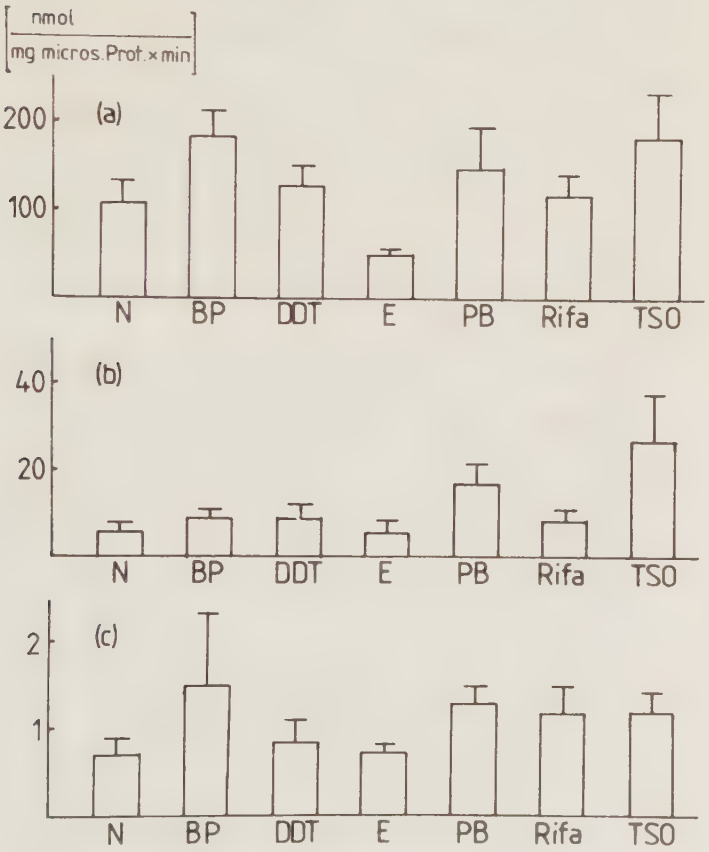
Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, ging diese Arbeit von der Hypothese aus, daß die UDP-Glucuronyltransferase ein heterogenes Enzymsystem aus mindestens zwei Formen ist. Sie wurden Naphthol- (Form I), Morphin-, Bilirubin- (Unterformen IIA und IIB)-UDP-Glucuronyltransferase genannt (siehe Kapitel 1.2). In der Literatur konnten die beiden Obergruppen I und II unter anderem durch Induktionsversuche unterschie-

den werden, in denen Methylcholanthren als Induktor der Form I und Phenobarbital als Induktor der Form II auftraten. In den vorliegenden Tierversuchen sollten diese Ergebnisse durch neue Induktoren überprüft und verifiziert werden. Es wurden die im Kapitel 3.3.2 aufgelisteten Induktoren verwendet. Phenobarbital erwies sich auch bei diesen Untersuchungen als ein potenter Induktor besonders der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase (IIA), in geringerem Maße auch der Bilirubin-konjugierenden Form (IIB). Ein geringerer Effekt ließ sich auch für die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase (I) nachweisen. Diese muß man als unspezifisch aktivierende Wirkung auffassen (43, 186). Die gefundenen Daten stimmen sehr gut mit den Literaturangaben überein. Als zweites wurde das Kanzerogen Benzpyren auf seine Auswirkung überprüft. Es zeigte eine signifikante Induktion der Naphthol- und der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase,aber keinen eindeutigen Einfluß auf die Aktivität des Bilirubin-konjugierenden Systems, da die Daten für die Form IIB eine große Streuung aufweisen. Benzpyren könnte also ein gemeinsamer Induktor für die Naphthol und die Morphin-UDP-Glucuronyltransferasen sein. DDT verhielt sich in ähnlicher Weise, hatte aber eine geringeren Effekt auf die Naphthol-Konjugation, die Auswirkung des Insektizides war nur auf die Morphin-UDP-Glucuronyltransferase (IIA) bemerkenswert.

Abbildung 29

Enzyminduktion bei Rattenmicrosomen der (a) Naphthol-, (b) Morphin- und (c) Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase

$\bar{x} \pm s_D$



Ein Einfluß auf die Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase zeigte sich nicht.
Auffällig war der Befund für das Polyoestradiol, es entwickelte eine vollkommen gegensätzliche Wirkung zu den anderen Substanzen, es war ein selektiver und potenter Hemmer der Aktivität der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase unter den gewählten Versuchsbedingungen, während es die anderen beiden Enzyme nicht veränderte.
Im Tierversuch hatte Rifampicin seinen ausgeprägtesten Effekt auf die Form IIB, daneben auch auf die Morphin-konjugierende Form. Auffallend an diesen Ergebnissen war, daß keine Erhöhung der Form I festgestellt werden konnte, ganz im Gegensatz zu den Befunden beim Menschen, die weiter unten zusammengefaßt werden.
Der potenteste Stimulator der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase ist das TSO, das die Reaktionsgeschwindigkeit auf das 5-Fache anwachsen ließ, wogegen sein Effekt auf die beiden anderen Formen bedeutend geringer ausfiel, es scheint sich hier also um einen selektiven Induktor der Form IIA zu handeln.
Wenn man alle diese Ergebnisse zusammenfassend einer Wertung unterzieht und sie in einen Bezug zueinander stellt, unterstreichen sie auf jeden Fall die Hypothese der Heterogenität der UDP-Glucuronyltransferasen. Mehrere Beobachtungen sprechen darüber hinaus dafür, daß sich die Formen IIA und IIB klar unterscheiden. Erstens besitzt Benzpyren keinen eindeutig induzierenden Effekt auf die Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase. Zwei-

tens wirkt DDT in größerem Ausmaße nur aus die Morphin-UDP-Glucuronyltransferase. Die stärkste Bestätigung hierfür dürften die Beobachtungen mit TSO sein, das einen starken selektiven Einfluß auf die Morphin-UDP-Glucuronyltransferase besitzt. Daß Morphin und Naphthol von verschiedenen Enzymen katalysiert werden, geht auch aus der Literatur deutlich hervor. Die vorliegenden Untersuchungen bestärken diese Annahme zusätzlich durch die selektive Inhibition der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase durch das Polyoestradiol und den stark induzierenden Effekt des TSO auf die Morphin-UDP-Glucuronyltransferase.
Die Untersuchungen stützen die eingangs gestellte Hypothese der Heterogenität der UDP-Glucuronyltransferasen. Zusätzlich kann man aber auch die Form IIB eindeutig von der Form IIA abtrennen.
In Abwandlung ergibt sich dann folgendes Bild:

Form I : Induktion durch Methylcholanthren, Hemmung durch Polyoestradiol
(= Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase)

Form II : Induktion durch Phenobarbital und trans-Stilben-oxid
(=Morphin-UDP-Glucuronyltransferase)

Form III : Induktion durch Rifampicin
(= Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase)

Eine genauere Charaktisierung läßt sich in Zukunft durch die Reinigung des Enzymsystems erreichen. Die

oben genannte Hypothese wurde für die Untersuchung mit menschlichen Mikrosomen übernommen. Deshalb sollten - soweit möglich - alle drei Formen des Enzyms immer gleichzeitig bestimmt werden.

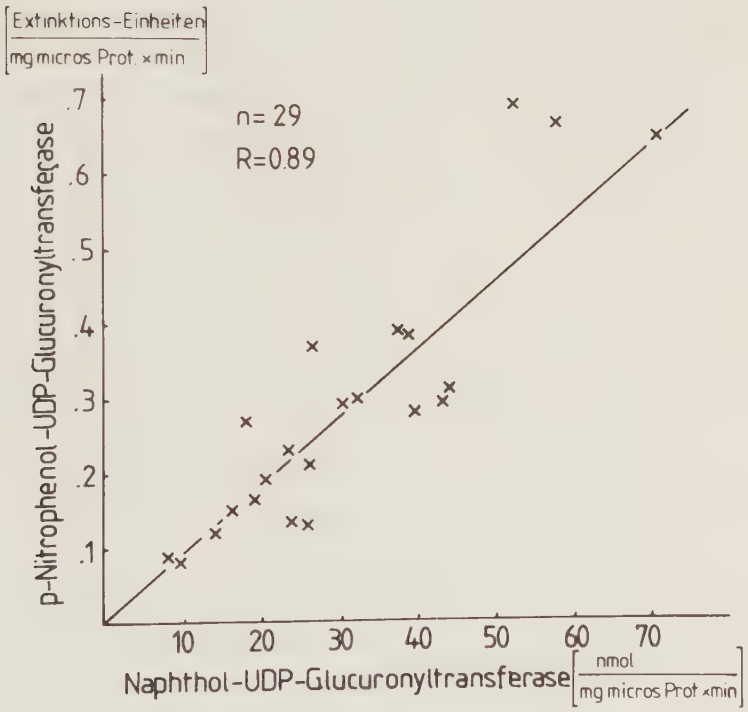
4.4 Menschliche Mikrosomen

4.4.1 Vergleich der Aktivität menschlicher und Rattenmikrosomen

Die Messungen bei beiden Spezies haben gezeigt, daß in Rattenmikrosomen die Aktivität für die UDP-Glucuronyltransferasen weitäus größer ist als bei menschlichem Untersuchungsgut (Aktivität pro Einheit mikrosomalen Proteins). Vergleicht man jeweils die Normalgruppe, so sieht man, daß bei der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase und bei der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase ein Faktor 10 gefunden werden kann, bei der Bilirubin-konjugierenden Form III dagegen nur ein Faktor 6.
Das bedeutet, daß im Vergleich zu Rattenmikrosomen die Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase im menschlichen endoplasmatischen Retikulum in Relation zu den beiden anderen Formen vermehrt zu finden ist. (Naphthol:Morphin:Bilirubin bei der Ratte 148:8:1 und beim Menschen 85:5:1)
Tabelle 9 und 10

Abbildung 30

Korrelation zwischen der Naphthol- und der p-Nitrophenol-UDP-Glucuronyltransferase in menschlichen Lebermicrosomen



4.4.2 Die Heterogenität der UDP-Glucuronyltransferasen in menschlichen Mikrosomen

Bei Patienten konnten verständlicherweise keine Induktionsversuche durchgeführt werden, um nachzuprüfen, ob eine Heterogenität der UDP-Glucuronyltransferasen vorliegt. Aber daneben gibt es noch andere Möglichkeiten, wenigstens Hinweise darauf zu erhalten, ob sich alle drei Enzyme gleich verhalten oder sich verschiedene Eigenschaften nachweisen lassen. Aus diesem Grunde wurden alle Ergebnisse von Patienten, bei denen mehrere Enzyme bestimmt worden waren, miteinander in Beziehung gesetzt. Wären alle Substrate von einem Enzym katalysiert worden, hätten sich strenge Korrelationen finden lassen müssen. Dies war der Fall (Tabelle 4, Abbildung 30) für die Naphthol-Umsetzungsgeschwindigkeit und die p-Nitrophenol-Konjugation. Die mit Hilfe teilgereinigter Enzyme aus tierischen Lebern gewonnenen Ergebnisse stützen den Verdacht, daß beide Substrate von derselben Form der UDP-Glucuronyltransferase umgesetzt werden (37). Dies läßt sich jetzt auch für das Enzym aus menschlicher Leber vermuten. Der gefundene Korrelationsfaktor (r) hat einen Wert von 0.89(!). Zwischen dem Umsatz der übrigen Substrate ließen sich keine vergleichbaren Beziehungen nachweisen (31). Deshalb erscheint es gerechtfertigt, von der Hypothese der Heterogenität auch beim Menschen auszugehen.

4.4.3 Altersabhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferase

Aus der Neonatologie ist bekannt, daß alle Neugeborenen postnatal erhöhte Bilirubinspiegel haben, 40 o/o haben Werte von über 5 mg/dl. Bei diesem sogenannten Icterus neonatorum liegen 98 o/o des Bilirubins im Serum in unkonjugierter Form vor, da die Fähigkeit der Leber, Bilirubin mit der Hilfe einer UDP-Glucuronyltransferase an Glucuronsäure zu binden, einen postnatalen Reifungsprozeß darstellt, dessen Abschluß erst nach der Geburt stattfindet. Nach etwa drei Wochen erreicht der Serumbilirubinwert dann wieder eine Höhe, die man auch bei normalen Erwachsenen findet (154, 166). Dieses Beispiel macht klar, daß die Ausstattung der Leber mit Enzymen eine altersabhängige Funktion sein kann. Das vorliegende Untersuchungsgut enthielt Daten von Patienten aus verschiedenen Altersstufen. Die Spanne reichte von 13 bis 85 Lebensjahren. Da es vorstellbar ist, daß sich die Aktivität ändert, wie andere biochemische Parameter (z.B. der Cholesterinspiegel), wurden diese Vermutungen überprüft (Kapitel 3.4.4). Dabei fand sich keine Altersabhängigkeit der Enzymaktivitäten bei den untersuchten Patienten. Aus diesem Grunde wurde bei der Auswertung späterer Untersuchungen auf eine besondere Aufgliederung in Altersgruppen verzichtet.

4.4.4 Geschlechtsabhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferasen

Viele medizinisch-biochemische Daten besitzen für beide Geschlechter unterschiedliche Durchschnitts-

werte, die Sichtung der Ergebnisse der Bestimmung der UDP-Glucuronyltransferasen wies einen so gearteten Unterschied nicht auf. Weder in Tabelle 5 ncoh in Tabelle 6 konnte eine signifikante Differenz zwischen beiden Kollektiven gefunden werden, was zu dem Schluß führte, daß sich mit den angewandten Untersuchungsmethoden kein Unterschied feststellen läßt.

Anmerkungen zu 4.4.3 und 4.4.4
Zu beiden Betrachtungen - die Alters- und die Geschlechtsabhängigkeit - muß man gewisse Einschränkungen machen, um die Wertigkeit der getroffenen Aussagen richtig auszudrücken. Da kein unbeschränkt großes Patientenkollektiv vorlag, mußten für beide Untersuchungen auch Patienten mit Lebererkrankungen miteinbezogen werden, so daß die jeweiligen Vergleichsgruppen nicht vollkommen homogen zusammengesetzt sind. Dennoch geben beide Darstellungen einen vorläufigen Hinweis, daß die Enzymaktivität weder vom Alter noch vom Geschlecht beeinflußt wird.

4.4.5 Die UDP-Glucuronyltransferase bei Patienten mit normaler Leberhistologie

Wie oben schon erwähnt, war es aus ethischen Gründen nicht möglich, zu den vorliegenden Untersuchungen Gesunde heranzuziehen. Eine Leberblindpunktion ist ein invasiver Eingriff, der mit einem gewissen Risi-

ko behaftet ist. Deshalb mußte die Normalgruppe aus anderen Probanden zusammengestellt werden. Hierzu wurden Patienten, deren Leberhistologie keine pathologischen Veränderungen aufwies ausgewählt. Alkohol-Konsumenten, Raucher und Patienten, die induzierende Pharmaka erhielten, wurden aus dieser ,,Normalgruppe'' ausgesondert, die in weitere Untergruppen unterteilt wurde. Träger von Gallensteinen, bei denen passagere Gallengangsobstruktionen in der Anamnese nicht auszuschließen waren, und Träger von Karzinomen des oberen Gastorintestinaltraktes, bei denen ein erhöhter Alkoholkonsum beteiligt sein könnte, wurden in gesonderten Gruppen aufgelistet.

4.4.5.1 Die Normalgruppe (NO)

Die Anzahl der Patienten, die alle oben genannten Bedingungen erfüllen, war recht klein, denn in den meisten Fällen wurde die klinische Indikation zur Leberbiopsie so gestellt, daß eine Veränderung der Histologie zu erwarten war. Keiner der Patienten der Normalgruppe hatte auffällige pathologische Veränderungen (Tabelle 8) der Routinelabordaten. (Tabelle 10)

4.4.5.2 Patienten mit Karzinomen im oberen Gastrointestinaltrakt (NC)

Obwohl die Patienten mit Karzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes keinen Alkoholabusus angaben und ihre Routinelabordaten ebenfalls unauffällig waren, erzielten sie dennoch Werte für die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase (Abbildung 31, Tabelle 10), die signifikant höher waren als die Normalwerte, gleiches trifft für die Morphinkonjugierende Form zu. Ob ein Zusammenhang zwischen diesen Beobachtungen und der Grundkrankheit besteht, läßt sich aus den Untersuchungen nicht sicher entnehmen.

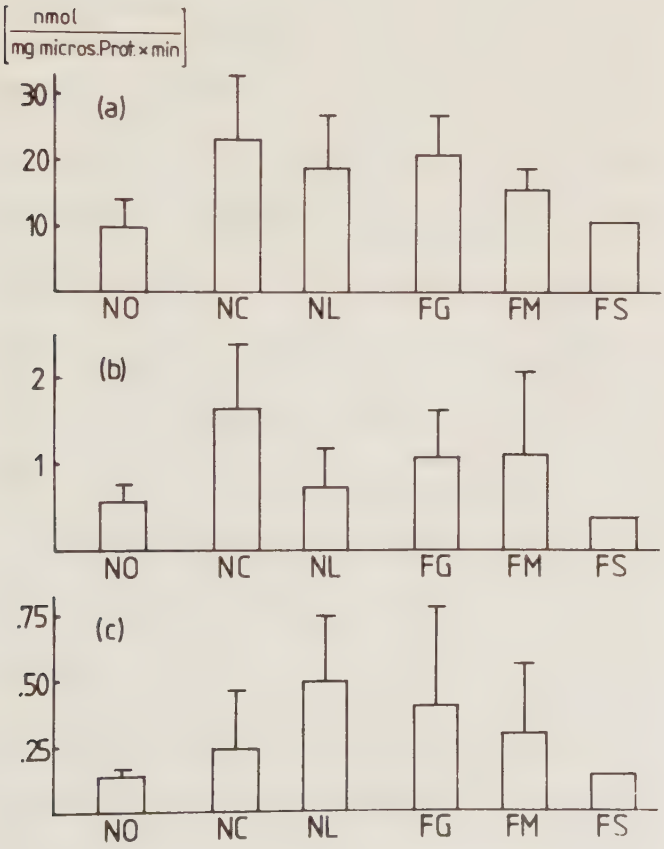
4.4.5.3 Patienten mit Cholelithiasis (NL)
(Abbildung 31, Tabelle 10)

Untersuchungen von Leberbiopsien haben zuerst bei Indios, später bei anderen Patienten mit Cholesteringallensteinen erbracht, daß im Vergleich zu Kontrollpersonen im Lebergewebe erhöhte Spiegel der ß-Hydroxy-ß-methyl-glutarsäure-CoA-Reduktase und verminderte der 7-alpha-Cholesterinhydroxylase auftreten (95, 200). Daneben kann auch der Cholesterinspiegel im Lebergewebe erhöht sein. Beide Beobachtungen zeigen deutlich, daß auf biochemischem Niveau Leberveränderungen bei Patienten mit Cholesteringallensteinen vorliegen können. Die UDP-Glucuronyltransferasen zeigen bei diesen Patienten für die Form I und die Form II (IIB) signifikant

Abbildung 31

Enzymaktivitäten bei menschlichen Microsomen, (a)Naphthol-, (b)Morphin- und (c)Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase

$\bar{x} \pm s_D$



erhöhte Werte, nicht dagegen für die Morphin-UDP-Glucuronyltransferase. - Dieses Verhalten unterstützt auch die Theorie der Heterogenität der menschlichen UDP-Glucuronyltransferasen, wie sie oben entworfen war -.

Die oben zitierten Hinweise deuten darauf hin, daß die Entstehung von Cholesteringallensteinen ihre Ursache auf der biochemischen Ebene der Leberzelle haben. (Die moderne Cholelithiasistherapie beruht im starken Maße auf einer Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, weniger auf einer direkten Erniedrigung der Lithogenität (88, 90, 168)). Daneben sind auch die UDP-Glucuronyltransferasen (74, 75, 76, 117) im Metabolismus von Gallenbestandteilen involviert, die Formen II und III konjugieren unter anderem auch Gallensäuren. Es konnte nachgewiesen werden, daß ein großer Teil der Gallensäuren in Stellung 3-alpha glucuroniert und auch sulphatiert werden (15, 21, 162), was ihre Wasserlöslichkeit aus physikalischen Gründen erhöht, sie aber ungeeigneter macht, als Emulgatoren Choleinsäuren zu bilden, da auch ihr hydrophober Molekülteil mit einer hydrophilen Gruppe versehen ist, alle geschilderten biochemischen Veränderungen würden in einer Erhöhung der Lithogenität der Galle resultieren: die erhöhte HMG-CoA-Reduktase führt zu einem erhöhten Anfall von Cholesterin, die erniedrigte 7-alpha-Cholesterin-Reduktase zu einer verminderten Synthese von Gallensäuren, die durch die erhöhte Aktivität der UDP-Glucuronyltransferasen (besonders der Form III) in

ihrer Emulgatorenfunktion behindert werden.
Als Erklärung für die Erhöhung der Form I und III der UDP-Glucuronyltransferasen bieten sich folgende Beobachtungen an. Auch bei Patienten mit Sichelzellanämie und damit verbundener Hyperbilirubinämie konnte eine erhöhte Aktivität der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase ebenso wie bei Obstruktionen der Gallenwege gefunden werden (25, 111). Bei dem untersuchten Kollektiv der Gallensteinträger handelte es sich um Patienten, die sich einer Cholecystektomie unterzogen haben, daraus läßt sich schließen, daß es bei diesen Patienten durch redizivierende Steinabgänge zu passageren extrahepatischen Verschlüssen gekommen sein könnte, die sich in einer Erhöhung der Naphthol- und Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferasen bemerkbar machen. Dies gilt auch für die Fälle, bei denen zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Erhöhung des Serumbilirubinspiegels festzustellen war. Diese durch die Beobachtungen am Menschen sich anbietende Hypothese konnte am Tierversuch nicht bestätigt werden (160, 184). Der Nachweis von Induktionsphänomenen ohne histologisches Korrelat ist nicht ungewöhnlich und wurde bei Patienten des Kollektivs der Karzinomträger im Gastrointestinal und bei Patienten unter tuberkulostatischer Therapie beobachtet. Unter dieser Hypothese würde es bei Gallensteinträgern durch passagere Verschlüsse zu einer Selbstperpetuierung der Gallensteinbildung durch die Konjugierung der Gallensäu-

ren kommen.

Auch wenn die untersuchte Gruppe für zwei männliche Probanden keinen Unterschied in den Befunden aufwies, muß man noch folgende Beobachtung in die Diskussion miteinbeziehen. Männliche Patienten unter Polyoestradiol zeigen ebenfalls eine erhöhte Aktivität der Formen I und III (Tabelle 10, Abbildung 34) ähnlich wie Patientinnen unter oestrogenhaltigen Antikonzeptiva. Vielleicht bewirkt der erhöhte Oestrogengehalt über die Induktion der Form III der UDP-Glucuronyltransferase die bekannte erhöhte Inzidenz für Gallensteine bei Frauen, besonders wenn sie oestrogenhaltige Antikonzeptiva zu sich nahmen, zusätzlich zur Erniedrigung der 7-alpha-Hydroxylase (199).

4.4.6 Die UDP-Glucuronyltransferase bei Patienten mit Leberepithelverfettung (Abbildung 31, Tabelle 10)

Als Leberepithelverfettung oder fettige Degeneration des Leberparenchyms wird die histologisch nachweisbare Anhäufung von Triglyceriden in Hepatozyten bezeichnet. Erst wenn der Triglyceridgehalt einen Wert von etwa 6 o/o (GEDIGK) überschreitet, wird das Fett histologisch in tröpfchenförmigen Ablagerungen in den Hepatozyten sichtbar. Zunächst werden kleine Fettropfen gespeichert (feintropfige Verfettung), mit zunehmender Ablagerung liegen größere Fettropfen im Grundplasma (großtropfige Verfettung) vor. Das

Ausmaß der Verfettung ist gleichzeitig ein Maß für die Stärke der Leberschädigung. Der fettigen Degeneration der Leber liegt eine Gleichgewichtsstörung im Fettstoffwechsel zu Grunde. Wichtigste Ursache ist der Alkoholismus, daneben auch Diabetes mellitus, Über- oder Unterernährung, hypoxische Schädigung, chronische Infekte sowie endogene und exogene Intoxikationen. Alle Leberverfettungen sind also pathologische Reaktionen auf Noxen, auf die die Leber mit einer morphologisch nachweisbaren Veränderung, der vermehrten Fetteinlagerung, reagiert. Die hier untersuchten Patienten, die eine Leberparenchymverfettung aufweisen, sind an verschiedenen Grundkrankheiten erkrankt. Patienten mit entzündlichen Leberveränderungen im Sinne einer Fettleberhepatitis wurden aus diesér Gruppe eliminiert.

4.4.6.1 Patienten mit geringgradiger Leberepithelverfettung (FG)

Bei diesen Patienten wurden normale oder leicht erhöhte Leberenzyme im Serum nachgewiesen (Tabelle 8). Kein Patient erhielt induzierende Medikamente. Unterteilt man diese Gruppe aufgrund klinisch-chemischer Befunde oder der diagnostisch gesicherten Haupterkrankungen weiter, läßt sich zwischen den Untergruppen kein Unterschied in den Aktivitäten nachweisen. Selbst ein erhöhtes Serumbilirubin hat keinen merklichen Einfluß. Solche Einflüsse des Bilirubins wurden zwar in der Literatur beschrieben, es fehlen

jedoch histologische Angaben (25, 111). Deshalb erscheint es angebracht, alle Patienten mit geringgradiger nicht alkoholischer Leberepithelverfettung in einer großen Gruppe zusammenzufassen (ohne Berücksichtigung sonst vorliegender Befunde). Für alle drei gemessenen UDP-Glucuronyltransferasen konnten erhöhte Mittelwerte festgestellt werden, auch wenn diese Ergebnisse nur für die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase eine hohe Signifikanz erreichen (große Streuung bei der Morphin-konjugierenden Form) (Tabelle 10, Abbildung 31).
Da viele der untersuchten Patienten an einem Gallensteinleiden erkrankt waren, lassen sich dieselben Deutungen heranziehen, die für die Patienten der Gruppe NL benutzt werden. Andererseits waren die meisten Patienten auch übergewichtig, eine Tatsache, die für die Entstehung der Leberparenchymverfettung nicht ohne Bedeutung sein dürfte. So könnte die Erhöhung der Aktivität der UDP-Glucuronyltransferasen als ein Phänomen verstanden werden, das schon bei den geringsten Leberveränderungen - wie sie nun mal Parenchymverfettungen darstellen - auftritt. Membranveränderungen als Folge eines veränderten Cholesterinmetabolismus dürften durch die Zugabe von Detergentien sich nicht stark auswirken. Es liegt daher nahe, eine wirkliche Zunahme der Enzymkonzentration im endoplasmatischen Retikulum der geschädigten Leber anzunehmen.

Die Veränderungen könnten im Sinne der im vorherigen Kapitel beschriebenen Hypothese mit der Genese von Gallensteinen zusammenhängen oder durch passagere Choledochusobstruktionen verursacht worden sein.

4.4.6.2 Patienten mit mittelgradiger Leberparenchymverfettung (FM) (Abbildung 31, Tabelle 10)

Wird die Noxe schwerwiegender, was sich in einer gesteigerten Fetteinlagerung in das Leberparenchym äußert, macht sich dies durch eine geringere Erhöhung der UDP-Glucuronyltransferasen bemerkbar. Bei allen drei Formen ist der Aktivitätsanstieg der UDP-Glucuronyltransferasen nicht mehr so deutlich (ausgenommen sind Alkoholiker). Will man die obigen Gedanken fortführen, müßte bei diesen Patienten die Schädigung ein Ausmaß erreicht haben, daß die Fähigkeit zur Erhöhung der Aktivität nicht mehr gegeben ist. Hier werden also zwei gegensätzliche Tendenzen wirksam, einmal die Erhöhung der Aktivität und zweitens die zunehmende Schädigung durch die Leberparenchymverfettung, letztere könnte allein mechanische Gründe haben.

4.4.6.3 Patienten mit schwerer Leberparenchymverfettung (FS) (Tabelle 10, Abbildung 31)

Bei den Probanden der dritten Gruppe hatte sich die Leber im Sinne einer schweren Leberparenchymverfettung verändert und die Schädigung einen noch schwer-

wiegenderen Grad erreicht. Dies müßte sich nach der geschilderten Hypothese durch eine niedrigere Enzymerhöhung bemerkbar machen, gleichbedeutend mit einer geringen oder fehlenden Erhöhung der Aktivitäten der UDP-Glucuronyltransferasen. Tatsächlich bestätigen die Untersuchungen von zwei Patienten diesen Trend (gilt nur für die Form I).

4.4.7 Patienten mit geringen unspezifischen Reaktionen der Leber (GM) (Tabelle 10, Abbildung 32)

Bei vielen extrahepatischen Erkrankungen, z. B. zahlreichen Infektionskrankheiten, bei Ulcus ventriculi, bei chronischem Rheumatismus und anderen, können uncharakteristische (unspezifische) Hepatitiden reaktiv entstehen. Es ist eine relativ geringfügige lymphozytäre und histiozytäre Infiltration in den unscharf begrenzten portalen Feldern nachweisbar, außerdem nur eine mäßige Proliferation von Sternzellen. Diese geringen mesenchymalen Reaktionen sind eine Antwort auf extrahepatische Noxen. Eine Schädigung der Hepatozyten ist histologisch nicht festzustellen. Im Gegensatz zu den Karzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes hat bei diesen Patienten der Einfluß der extrahepatischen Prozesse zu sichtbaren Veränderungen des Lebermesenchyms geführt. Ebenso wurde die ,,Fernwirkung'' der extrahepatischen Prozesse auf UDP-Glucuronyltransferasen untersucht. Es wurde nur die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase-Aktivität untersucht. Bei sechs Patienten mit gastroinestinalen Tumoren (ohne jegliche

Leberveränderungen) ließ sich kein Unterschied finden.

Faßt man diese Ergebnisse zusammen, so scheint es wahrscheinlich, daß die Leber bei geringen Noxen mit einem Anstieg der UDP-Glucuronyltransferasen reagiert. Erst bei länger andauernder Schädigung oder stärkeren Noxen kommt es zur zunehmenden Verfettung der Leberzelle und Abnahme der Aktivitäten der Glucuronyltransferasen.

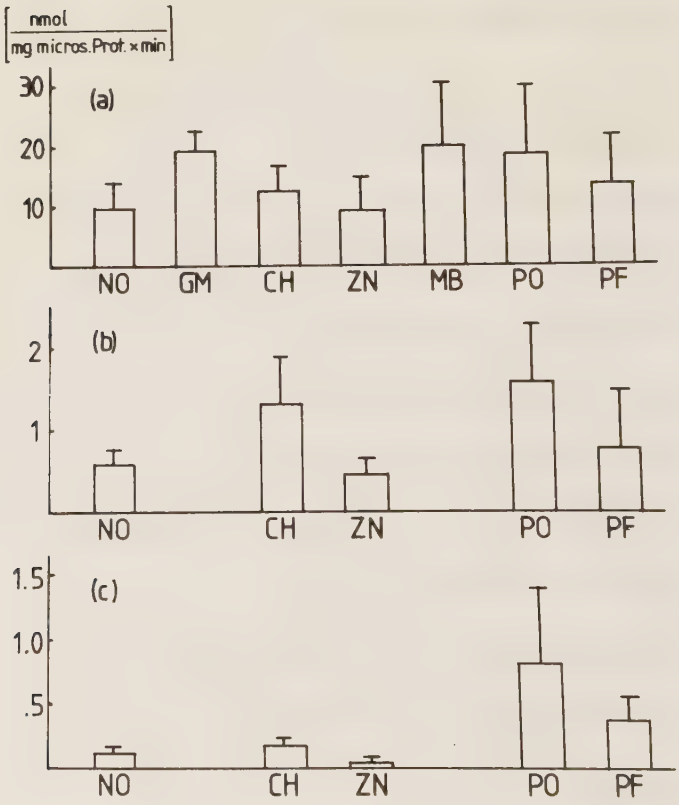
4.4.8 Patienten mit chronischen Hepatitiden (CH) (Tabelle 10, Abbildung 32)

Die chronische Hepatitis ist histologisch durch eine entzündliche (lymphozytäre, histiozytäre, mitunter auch plasmozytäre) Infiltration und eine Vermehrung des Bindegewebes in den verbreiterten portalen Feldern gekennzeichnet. Eine aktive Schädigung des Parenchyms fehlt oder ist nur geringgradig ausgeprägt. Die UDP-Glucuronyltransferasen zeigten keine Veränderungen gegenüber der Normalgruppe. Besonders eindrucksvoll war dies für die Naphthol-konjugierende Form I nachweisbar. Diese Ergebnisse lassen sich wie folgt interpretieren, entweder liegt im Zustand der Chronizität kein Parenchymschaden vor oder die Leberzelle ist nicht mehr in der Lage, mit einer Enzymerhöhung zu antworten.

Abbildung 32

Enzymaktivitäten bei menschlichen Microsomen, (a)Naphthol-, (b)Morphin- und (c)Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase

$\bar{x} \pm s_D$



4.4.9 Patienten mit nicht alkoholischer Leberzirrhose (ZN)

Als eine Leberzirrhose wird eine Entzündung mit Leberparenchymnekrosen und nachfolgendem Umbau der gesamten Leber bei fortschreitender, läppchenzerstörender, entzündlicher Fibrose, knotiger Regeneratbildung des Parenchyms und Störung der intrahepatischen Zirkulation bezeichnet. Diese kurze Definition der Leberzirrhose verdeutlicht eindringlich, daß es sich bei dieser Leberveränderung um eine tiefgreifende Störung der Integrität und damit auch der Funktion handelt. Die Untersuchungen der UDP-Glucuronyltransferasen ergaben, daß für die Formen I und II (IIA) keine Verminderung der Aktivität bezogen auf das mikrosomale Protein vorlag, sondern ein Ergebnis gefunden wurde, das mit der Normalgruppe übereinstimmt. Die Erklärung dafür weicht nicht von der Hypothese ab, die für die chronischen Hepatitiden entwickelt worden sind. Die tiefgreifende Zerstörung der Leber läßt den Schluß zu, daß in diesem Falle eine Schädigung des Leberparenchyms vorliegt, das nicht mehr mit einem Anstieg der UDP-Glucuronyltransferasen reagieren kann. Für die Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase ist sogar ein relativer Mangel festzustellen. Diese drei Beobachtungen stützen die Hypothese über die Heterogenität der UDP-Glucuronyltransferasen im menschlichen Organismus. Darüber hinaus sind die Ergebnisse noch für andere Aussagen wichtig. Bei jeder Leberzirrhose liegt eine

absolute Verminderung der Leberparenchymmasse vor, auch wenn sich die Aktivität der konjugierenden Enzyme im einzelnen Hepatozyten nicht verändert, ist dennoch die gesamte Kapazität in der Leber vermindert. In diesem Fall trifft dies für die Formen I und II zu. Bei der Bilirubin-spezifischen Form III konnte dagegen sogar eine Verminderung pro mg mikrosómalen Proteins nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis erklärt die starke Abnahme der Fähigkeit des Organismus, Bilirubin in ausreichendem Maße zu konjugieren. Man muß also in den Fällen der nicht-alkoholischen Leberzirrhose damit rechnen, daß die Aktivität der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase stark eingeschränkt ist, was sich in der Verminderung der Bilirubin-Exkretion mit folgender Hyperbilirubinämie bemerkbar machen kann. In vielen der hier untersuchten Fällen konnte diese Hyperbilirubinämie angetroffen werden. Die Elimination auch anderer Stoffe über die Galle, wie zum Beispiel Chloramphenicol,die als Glucuronide ausgeschieden werden, ist eingeschränkt.

4.4.10 Patienten mit granulomatösen Entzündungen der Leber (MB) (Tabelle 10, Abbildung 32)

In allen untersuchten Fällen waren neben den Boeck'schen Granulomen eine unspezifische geringgradige Entzündung der Leber histologisch nachweisbar, die derjenigen in 4.4.7 entsprach. Im Verhältnis zur Leberparenchymmasse tritt der Leberanteil deutlich

zurück, der durch die vereinzelten Granulome verändert ist. Deshalb werden Mikrosomen, die durch die Homogenisierung der Leberbiopsien gewonnen wurden, hauptsächlich die mikrosomale Aktivität des Leberparenchyms wiederspiegeln, und nicht die Aktivität von Entzündungszellen oder mesenchymalen Zellen, die in das Lebergewebe eingewandert sind. Daher müßte in diesen Fällen die UDP-Glucuronyltransferase-Aktivität der von Patienten mit alleiniger geringgradiger unspezifischer mesenchymaler Reaktion entsprechen. Für beide Kollektive wurden dementsprechend auch gleiche Enzymaktivitäten festgestellt (Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase: GM= 19.3 $\pm$ 3.1 gegenüber MB= 19.6 $\pm$ 11.1 nmol/mg mikrosomales Protein/min). Bei den Boeck-Patienten war die Streuung allerdimgs sehr groß. Die Erhöhung der Aktivität beruht wahrscheinlich auf der Wirkung granulomatöser Entzündungen auf das Leberparenchym.

4.4.11 Patienten mit chronisch rezidivierender Pericholangitis

In dieser Gruppe der nicht-eitrigen destruierenden Cholangitiden und Pericholangitiden wird die Entwicklung der extra- und auch der intrahepatischen Cholangitis und damit verbundenen Pericholangitis durch eine Cholestase begünstigt. In den meisten Fällen ist die Ursache eine Choledocholithiasis. Aber auch Strikturen und Tumoren der ableitenden Gallenwege oder in deren Umgebung spielen eine

Rolle. Diese extrahepatischen Cholestasen sollten bei menschlichen Mikrosomen zu einer Erhöhung der UDP-Glucuronyltransferasen führen, entsprechend den bereits früher zitierten Untersuchungen (25). Als induzierendes Agens bei Cholestase spielt wahrscheinlich die intrahepatische Erhöhung der Bilirubin-Konzentration eine Rolle, analog der Erhöhung der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferae bei Patienten mit Sichelzellanämie (111). Leider konnte dies bis heute mit Tierversuchen nicht sicher bestätigt werden.

4.4.11.1 Patienten mit chronisch rezidivierender Pericholangitis (PO) (Tabelle 10, Abbildung 32)

Bei allen diesen Patienten hatte die Cholangitis mit begleitender Pericholangitis noch nicht zu einer histologisch nachweisbaren Schädigung der Leberzelle geführt. Die Patienten hatten klinisch-chemisch eine Cholestase mit erhöhten Blutwerten der alkalischen Phosphatase und des Bilirubins, letzterer dürfte mit einer Erhöhung der intrahepatischen Bilirubinkonzentration einhergehen. Analog der oben dargestellten Hypothese sollte dies mit einer Erhöhung der UDP-Glucuronyltransferasen einhergehen. Tatsächlich äußert sich dieser Effekt auch in einer Vermehrung der Aktivität aller drei Formen, für die Bilirubin- um 700 o/o, für die Naphthol- um 89 o/o und für die Morphin-UDP-Glucuronyltransferase um 273 o/o.

4.4.11.2 Patienten mit chronisch rezidivierender Pericholangitis und Leberparenchymverfettung (PF) (Tabelle 10, Abbildung 32)

Bei einer gleichzeitigen Leberparenchymverfettung geringen oder mittleren Grades dagegen ist die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase normal, die Aktivitäten für die beiden anderen Formen liegen nur gering über der Norm.

Faßt man die Ergebnisse beider Pericholangitisformen zusammen, so scheint die Hypothese bestätigt zu werden, daß die UDP-Glucuronyltransferasen durch geringe Noxen aktiviert werden können, während gröbere Schädigungen diese Fähigkeit unterdrücken.

4.4.12 Infiltration eines systemischen Prozesses (IS)

Diese kurze Zusammenfassung läßt keine Interpretation der Ergebnisse zu, auch wenn eine nicht signifikante Erhöhung der Aktivität vorzuliegen scheint.

4.4.13 Anmerkungen

Für eine ,,Nahwirkung'' entzündlicher oder tumorö-ser Prozesse auf die Aktivität der UDP-Glucuronyltransferasen spricht eine Beobachtung, die an zwei Patienten mit primärem Leberzellkarzinom gemacht werden konnte. Bei beiden Fällen war es durch eine ausgedehnte chrirurgische Resektion möglich,

Gewebeproben aus verschiedenen Arealen zu untersuchen. Eine Probe stammte jeweils aus dem entarteten Gewebe, eine zweite aus dem Nahbereich einige Zentimeter vom Tumor entfernt und eine dritte aus dem tumorfernen Lebergewebe. Als Testenzym wurde in allen Fällen nur die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase gemessen. Im Karzinomgewebe selbst ließ sich keine Aktivität nachweisen, in der näheren Umgebung dagegen ein Wert, der bei beiden Patienten etwa dem Zehnfachen der Norm entsprach. Im ,,gesunden'' Fernbereich zeigte das Gewebe Aktivitäten, die denen der Normalgruppe vergleichbar waren.

4.4.14 Nicht klassierte Ergebnisse finden sich in Tabelle 9

4.4.15 Einfluß von Medikamenten und Alkohol auf die Aktivität der UDP-Glucuronyltransferasen

Wie in der Einleitung schon näher ausgeführt, gibt es verschiedene Hinweise darauf, daß exogene Faktoren, Medikamente und Genußmittel, einen Einfluß auf die Aktivität der UDP-Glucuronyltransferasen ausüben. In Tierversuchen konnten diese Annahmen eindeutig mit Ergebnissen untermauert werden. Am Beispiel des Rauchens waren schon Hinweise für einen Einfluß eines Genußmittels gezeigt worden. Aus verständlichen Gründen konnte bei Menschen nicht derselbe Untersuchungsweg eingeschlagen

werden, der bei den Tierversuchen beschritten worden war. Es mußte ein retrospektiv orientiertes Verfahren gewählt werden, indem die vorhandenen Lebergewebsproben im Nachhinein Patientengruppen mit entsprechender Therapie und gleichen Begleitveränderungen zugeordnet wurden. Eine der wichtigsten Grundlagen für die Aussagekraft einer Forschung dieser Art ist die Interpretation der histologischen Einflüsse auf die Aktivität der untersuchten Leberenzyme, unterläßt man diese langwierigen und aufwendigen Voruntersuchungen, dann muß man wohl davon ausgehen, daß zumindest für die UDP-Glucuronyltransferasen eine aussagekräftige Interpretation der Werte nicht möglich sein dürfte. Leider mußte festgestellt werden, daß die oben beschriebenen histologischen Einflüsse auf vielfältige Weise interferieren. Bei den folgenden Untersuchungen ist es daher nicht immer möglich, in allen Fällen ein klares Ergebnis zu gewinnen.

4.4.15.1 Rifampicin-Patienten mit normaler Leberhistologie (RN) (Tabelle 10, Abbildung 33)

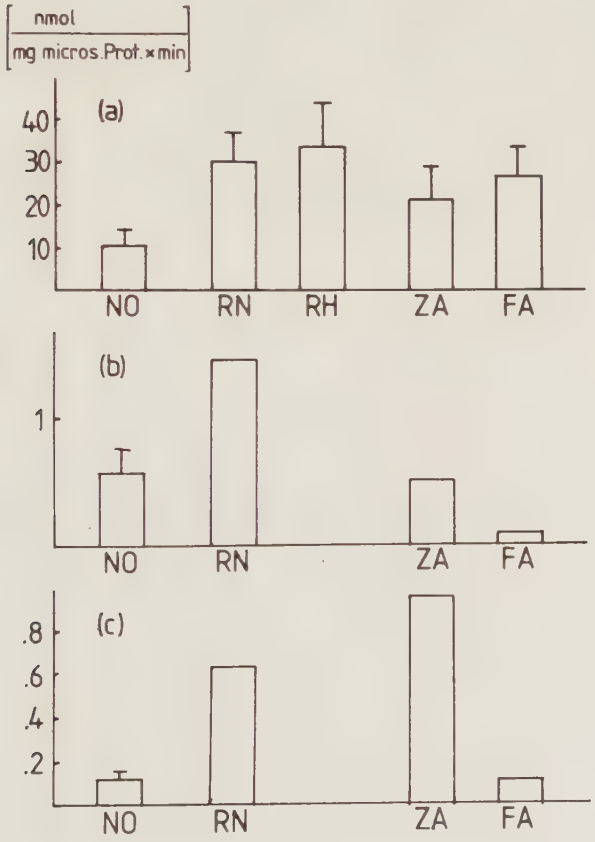
Aus mehreren klinischen Beobachtungen (44, 45, 46, 129, 137, 138) wurde geschlossen, daß Rifampicin die Ausstattung der Leber an mikrosomalen Enzymen erhöht. Die vorliegenden Tierversuche lassen erkennen, daß dieses Medikament im therapeutisch angewandten Dosisbereich die UDP-Glucuronyltransfe-

rasen in unterschiedlicher Ausprägung induzieren (außer der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase). In der Literatur liegen keine Untersuchungen über den Einfluß von Medikamenten auf die UDP-Glucuronyltransferasen im menschlichen Organismus vor, so auch nicht für das Rifampicin. Leider konnte wegen der nur geringen Menge des vorliegenden Leberbiopsiematerials bei Patienten mit Tuberkulose nur die Naphthol-konjugierende Form als Testenzym bestimmt werden. Wider Erwarten zeigte sich bei diesen Patienten (deren Leberhistologie keinerlei Veränderungen aufwies) eine extrem starke Erhöhung der relativen Aktivität dieses Enzyms, die das Dreifache der Normalgruppe erreichte (Tabelle 10, Abbildung 33). Bei je einem Fall wurden die beiden anderen UDP-Glucuronyltransferasen untersucht. Der Anstieg der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase war dabei stärker. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den entsprechenden Tierversuchen und müssen wohl so gedeutet werden, daß auch bei den UDP-Glucuronyltransferasen eine einfache Übertragung vom Tier auf den Menschen nicht möglich ist. Entweder ist das Induktionsverhalten der im menschlichen Organismus vorliegenden UDP-Glucuronyltransferasen vollkommen verschieden, oder das Rifampicin zeigte beim Menschen einen allgemein induzierenden Effekt, der im Gegensatz zur Ratte nicht nur selektiv auf die Formen II und III wirkt.

Abbildung 33

Enzymaktivitäten bei menschlichen Microsomen, (a)Naphthol-, (b)Morphin- und (c)Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase

$\bar{x} \pm s_D$



4.4.15.2 Rifampicin-Patienten mit Veränderung der Leberhistologie (RH) (Tabelle 10, Abbildung 33)

Diese Gruppe entsprach in ihrer Aktivität (für das Testenzym) der vorherigen, ließ sich aber wegen der histologischen Leberveränderungen nicht mit der Normalgruppe vergleichen. Deshalb diente eine andere inhomogene Gruppe als Bezug, nämlich die oben beschriebene Gruppe der Nichtraucher. Auch dann konnte statistisch ein eindeutiger Unterschied mit einer Erhöhung der Aktivität der Form I nachgewiesen werden.

4.4.15.3 Vergleich beider Rifampicin-Gruppen

Da bei diesen Gruppen kein Unterschied in der Aktivität der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase festgestellt werden konnte, liegt der Schluß nahe, daß der Einfluß des Rifampicins die Veränderungen, die vom histologischen Befund des Lebergewebes herrühren, überwiegt. Die Aktivität der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase war in diesen beiden Gruppen die höchste aller Kollektive. Man besitzt somit einen potenten Induktor der Form I der UDP-Glucuronyltransferasen. Das dürfte vermutlich aber auch für die beiden anderen Formen zutreffen, wie es anhand von Einzelbestimmungen der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase und der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase in menschlichem Biopsiematerial, aber auch bei den Tierversuchen gezeigt werden konnte.

4.4.15.4 Effekte des Polyoestradiols (E) (Tabelle 10, Abbildung 34)

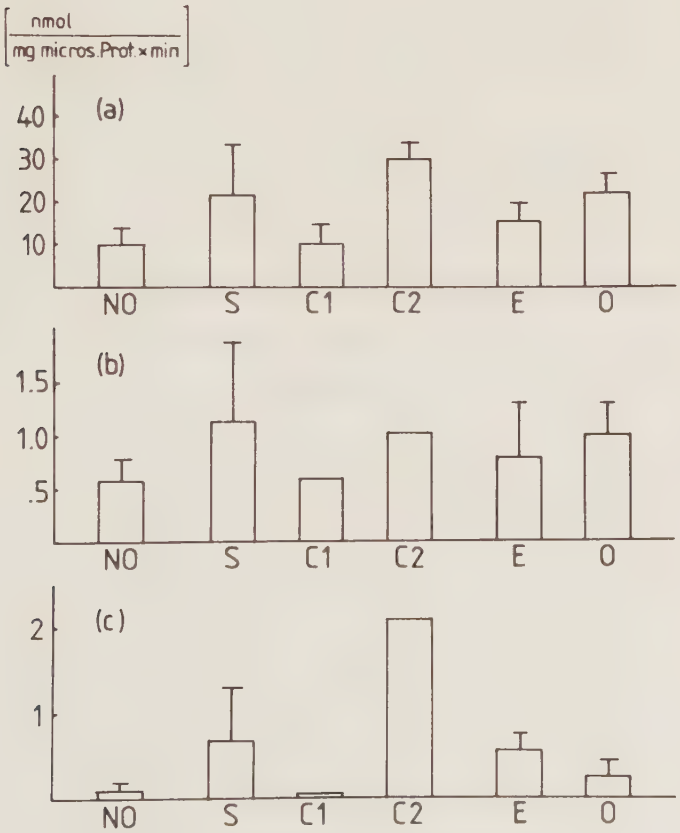
Histologische Untersuchungen zeigten, daß die Therapie mit Polyoestradiol in den angewandten therapeutischen Dosen nahezu immer eine reaktionslose intrahepatische zentrolobuläre Cholestase auslöst. Literaturergebnisse (72, 61) sprechen dafür, daß Oestrogene sowohl bei Ratten als auch beim Menschen neben einer intrahepatischen Cholestase mit einer signifikanten Erhöhung einiger mikrosomaler Enzyme einhergehen können. In dieser Arbeit wurde das Spektrum der enzymatischen Befunde um die Aktivitäten der UDP-Glucuronyltransferasen erweitert. Im Tierversuch erwies sich, wie oben näher dargestellt, dieses Medikament als selektiver Inhibitor der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase, während die beiden anderen Formen bei Anwendung therapeutischer Konzentrationen nicht beeinflußt wurden. Anders sind die Resultate bei Messungen mit Mikrosomen aus menschlicher Leber. Während die Morphin-UDP-Glucuronyltransferase keine Erhöhung der Aktivität aufwies, wurden die beiden anderen doch deutlich positiv beeinflußt (Abbildung 34). Die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase zeigte einen Anstieg um 50 o/o, weit darüber hinaus geht jedoch die Steigerung der Aktivität der Bilirubin-konjugierenden Form, die das 5-Fache des Normalwertes erreicht. Zu berücksichtigen ist allerdings die geringe Probandenzahl der Gruppen.

Wenn das Kollektiv aller Nichtraucher als Vergleichsgruppe herangezogen wurde, (um histologische Nebenbefunde bei diesen Probanden nicht zu vernachlässigen), konnte kein Unterschied nachgewiesen werden.
Daher müssen die Ergebnisse sehr vorsichtig interpretiert werden. Wahrscheinlich wird aber bei Vergrößerung der Probandenzahl mit einer Erhöhung der Aktivität der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase nach Polyoestradioltherapie zu rechnen sein.
In einem der vorherigen Kapitel wurde die Hypothese dargestellt, daß die Veränderungen der Enzymaktivität, die bei Patienten mit Cholelithiasis zu finden sind, eventuell durch rezidivierende passagere Verschlüsse des Ductus choledochus ausgelöst worden sein. Es wurden in der Gruppe ohne histologische Leberveränderungen (NL) bei den Enzymformen I und III erhöhte Aktivitäten gemessen. Dagegen blieb die Morphin-UDP-Glucuronyltransferase nahezu unverändert. Bei einer Cholestase ist beim Menschen offensichtlich besonders mit einer Erhöhung der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase zu rechnen, bei der extrahepatischen Cholestase scheint auch die Form I stark anzusteigen. Diese Ergebnisse unterstützen die Vorstellung, daß auch im menschlichen Organismus mit heterogenen Formen der UDP-Glucuronyltransferasen zu rechnen ist, diese verhalten sich anders als im tierischen Organismus.

Abbildung 34

Enzymaktivität bei menschlichen Microsomen, (a)Naphthol-, (b)Morphin- und (c)Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase

$\bar{x} \pm s_D$



4.4.15.5 Effekte der Spironolacton-Therapie (S) (Tabelle 10, Abbildung 34)

Die Größe der Gruppe dieser Patienten war zu gering, um zusätzliche histologische Einflüsse und exogene Ursachen sicher auszuschließen. Unter diesen Patienten fanden sich auch mehrere Alkoholiker. So konnte zwar eine Erhöhung für alle Enzyme gegenüber der Normalgruppe gemessen werden, aber ein Unterschied im Vergleich zur unten beschriebenen Gruppe der Alkoholkranken ließ sich mit den vorliegenden Daten nicht nachweisen. Eine erhöhte Aktivität fand sich aber auch bei zwei Patienten, deren Lebern unauffällig erschienen und bei denen kein Alkoholabusus vorlag. In Tierversuchen wurde ein induktiver Effekt von anderen Autoren nachgewiesen (160, 161).

4.4.15.6 Effekte der Corticoid-Therapie (Tabelle 10, Abbildung 34)

Eine Interpretation der Daten ist ebenfalls wegen der Heterogenität des Materials erschwert. Es scheint, daß Corticoide auf gering alterierte Lebern einen induktiven Einfluß auf die UDP-Glucuronyltransferasen - nachgeprüft mit der Naphtholkonjugierenden Form, Einzelbeobachtungen für die beiden anderen Enzyme ausüben, während bei massiven Leberschäden dieser Effekt nicht mehr nachweisbar ist. Die Bilirubin-Ausscheidung dürfte also bei einer Steroidtherapie chronischer entzündlicher Lebererkrankungen nicht wesentlich beein-

flußt werden.

4.4.15.7 Oestrogen-haltige Antikonzeptiva (O)
(Tabelle 10, Abbildung 34)

Neben der relativ homogenen Gruppe der Prostata-Karzinom-Patienten sind auch Patientinnen, die unter einer antikonzeptionellen Therapie mit oestrogenhaltigen Präparaten standen, untersucht worden. Die Leberhistologien waren bei diesen Fällen uneinheitlich, aber dennoch zeigten auch diese Patientinnen Ergebnisse, die in etwa den oben dargestellten entsprachen.

4.4.15.8 Einfluß des Alkohol-Abusus auf die Aktivität der UDP-Glucuronyltransferasen

Neben dem Zigarettenrauchen spielt zweifelsohne der Alkoholkonsum eine überragende Rolle unter den weit verbreiteten Genußgiften. Eine Beeinflussung der UDP-Glucuronyltransferasen durch das Rauchen konnte in dieser Arbeit schon dargestellt werden. Aus der Literatur ist eine Beobachtung bekannt, die als Hinweis auf eine Induktion der Bilirubin-konjugierende Form gelten kann: die Therapie des Icterus neonatorum mit pränataler Alkoholapplikation (180). Bei diesen Untersuchungen wurden zwei Gruppen unterschieden: Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose und Patienten, die nur eine Leberparenchymverfettung aufwiesen. Da

bei all diesen Patienten nur geringe Mengen bioptischen Materials zur Verfügung standen, konnte nur die Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase als Testenzym bestimmt werden (obwohl die zitierte klinische Beobachtung auch für eine Aktivierung der Bilirubin-konjugierenden Form sprach).

4.4.15.8.1 Alkoholische Leberzirrhose (ZA)
(Tabelle 10, Abbildung 33)

Das Ergebnis bei diesen Patienten erstaunte, denn im Gegensatz zu Patienten mit einer Leberzirrhose anderer Genese konnte bei ihnen eine signifikante Erhöhung der Aktivität der Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase gemessen werden. Eine Einzelmessung der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase zeigte sogar eine 8-fache Steigerung. Aus diesen Ergebnissen läßt sich der Schluß ziehen, daß Alkohol in einer Dosis, die einerseits eine histologische Störung des Leberparenchyms hervorruft, andererseits als Induktor der Glucuronyltransferase (nachgewiesen für die Form I) wirkt, in summa eine Erhöhung der Glucuronyltransferaseaktivität pro mg mikrosomalen Proteins verursacht.

4.4.15.8.2 Alkoholische Fettleber (FA)
(Tabelle 10, Abbildung 33)

Nicht so eindeutig lassen sich Aussagen bei diesen Patienten machen, weil auch in den Fällen mit Leberparenchymverfettung anderer Genese eine Erhöhung der Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Aber dennoch erreichen sie Werte, die nicht nur die Normalgruppe weit übertreffen, sondern auch höher sind als bei den Patienten mit andersartigen Verfettungen.

4.4.15.8.3 Anmerkung

Aus beiden Untersuchungen kann man zusammenfassend den Schluß ziehen, daß man bei Alkoholikern in den meisten Fällen mit einer Erhöhung der UDP-Glucuronyltransferasen zu rechnen hat, was sich in einem geringeren Effekt bestimmter Pharmaka bemerkbar machen könnte. Dies könnte unter anderem für Chloramphenicol gelten. Erhöhte Bilirubinwerte bei Leberzirrhose äthylischer Genese dürften nicht durch eine verminderte Aktivität der UDP-Glucuronyltransferasen bedingt sein.

5. Zusammenfassung

Bei der Elimination von Pharmaka, Fremdstoffen (Kanzerogene) und endogenen Substanzen (Bilirubin, Gallensäuren) sind offensichtlich verschiedene UDP-Glucuronyltransferasen beteiligt.

5.1 Methode, Enzymcharakteristik, Reproduzierbarkeit

Da mit kleinem Probenmaterial eine Reinigung und Auftrennung der UDP-Glucuronyltransferasen nicht möglich ist, wurde versucht, die Aktivität verschiedener Glucuronyltransferasen durch Verwendung verschiedener Enzymsubstrate zu erfassen. Hierzu war die Anwendung und Entwicklung von Mikromethoden erforderlich. Mit diesen Mikromethoden wurde die Enzymcharakteristik (Protein-/Zeit-/Substrat-Abhängigkeit) sowohl für Rattenlebermikrosomen als auch für menschliche Lebermikrosomen erstellt.
Es konnte eine Korrelation zwischen der menschlichen Aktivität der p-Nitrophenol- und 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase festgestellt werden (Korrelationskoeffizient $r = 0.89$), die Morphin- und Bilirubin-Glucuronidierung hingegen ist in den einzelnen Leberproben sehr unterschiedlich. Dafür sprechen auch die aus der Literatur bekannten und in dieser Arbeit erwähnten Induktionsversuche mit Ratten. Bei Untersuchungen an der menschlichen Leber unterschieden sich die Aktivitäten in Mikro-

somen aus kleinen Proben (Nadelbiopsiematerial, 10 bis 20 mg Leberfrischgewicht) nicht von den Aktivitäten in Mikrosomen, die mit der üblichen Makromethode aus Leberresektionsmaterial gewonnen wurden.Eine Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferaseaktivitäten ließ sich anhand des vorliegenden Probematerials nicht feststellen.

5.2 Exogene Einflüsse auf die Glucuronyltransferase-Aktivitäten beim Menschen

Exogene Einflüsse, wie Alkohol und Rauchen, führten zu einem deutlichen Anstieg der mittleren Aktivität der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase, der Einfluß von Pharmaka konnte nur anhand von kleinen Kollektiven und Einzelfällen untersucht werden. Dabei ließ sich bei Patienten, die mit einer tuberkulostatischen Dreifachtherapie behandelt wurden, eine deutliche Erhöhung der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase auf das 3fache der Norm nachweisen. Ein Anstieg der UDP-Glucuronyltransferaseaktivität war auch noch bei Tuberkulose-Patienten mit histologisch und klinisch-chemisch nachweisbarer Hepatitis mit oder ohne Leberfibrose zu zeigen. Dieser Anstieg ist vermutlich auf die induzierenden Eigenschaften des Rifampicin zurückzuführen. Unter Polyoestradiolphosphat ließ sich ebenfalls ein Anstieg der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase

(um ca. 50 o/o) und der Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase (um ca. 400 o/o) nachweisen, während die Morphin-konjugierende Form keine Erhöhung der Aktivität aufwies. Eine statistische Signifikanzberechnung ist wegen der Kleinheit der Gruppen allerdings mit Vorsicht zu interpretieren. Daß diese Effekte von Pharmaka dosisabhängig sind, konnte anhand der Tierversuche mit Polyoestradiol gezeigt werden: bei exzessiv hoher Dosierung (6.7 mg Polyoestradiolphosphat pro kg Körpergewicht pro Monat) ist in Rattenlebermikrosomen eine um 50 o/o reduzierte Aktivität der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase nachweisbar. Spironolacton scheint beim Menschen ebenfalls in therapeutischen Dosen zu einem Aktivitätsanstieg der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase zu führen. Die untersuchte Patientengruppe ist jedoch zu heterogen, um enggültige Aussagen zu machen. Das Gleiche gilt für Corticoide, die bei histologisch unauffälligen Lebern einen induzierenden Effekt auszuüben scheinen, während dieser bei chronischen Leberschäden nicht nachweisbar ist. Bei Patientinnen, die oestrogenhaltige Antikonzeptiva einnahmen, war teilweise auch ein leichter Anstieg der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase zu verzeichnen, eine statistische Sicherung gelang jedoch nicht.

5.3 Einfluß von Lebererkrankungen auf die Glucuronyltransferase. Aktivitäten beim Menschen

Akute und chronische Leberschäden führten zu einem ganz unterschiedlichen Verhalten der UDP-Glucuronyl-

transferaseaktivitäten. Während bei unspezifischen entzündlichen (Begleit-)Reaktionen der Leber im Mittel ein deutlicher Enzymanstieg erkennbar ist, läßt sich bei Patienten mit chronischen Hepatitiden unter Leberzirrhosen kein Anstieg der UDP-Glucuronyltransferasen mehr nachweisen, die Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase ist bei Leberzirrhotikern nicht-alkoholischer Genese sogar deutlich erniedrigt (Aktivität pro mg mikrosomales Protein). Bei granulomatösen Hepatitiden ließ sich hingegen wiederum eine leichte Erhöhung der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase darstellen. Auch bei Patienten mit nicht-alkoholischer Fettleber war die durchschnittliche Aktivität der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase erhöht, noch stärker jedoch bei alkoholischen Fettlebern, aber auch bei der alkoholischen Leberzirrhose.

5.4 Unterschiede der Enzymkinetik bei Ratte und Mensch

Enzymkinetsche Untersuchungen mit Lebermikrosomen der Ratte und des Menschen ließen für alle drei untersuchten Substrate (1-Naphthol, Morphin, Bilirubin) bei beiden Spezies die gleichen Enzym-Substrat-Affinitäten erkennen. Die Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung war jedoch mit Rattenlebermikrosomen ca 6 bis 10 mal höher als mit menschlichen Lebermikrosomen.

5.5 Induktionsversuche bei der Ratte

Ergänzende Untersuchungen bei der Ratte ließen erkennen, daß nicht nur die Cytochrom-P-450-abhängigen Enzyme sondern auch die UDP-Glucuronyltransferasen unter Rifampicin keinen nennenswerten Anstieg zeigten, nur die Bilirubin-UDP-Glucuronyltransferase war signifikant auf 180 o/o angestiegen.
Die besonders starke Induktion der Morphin-UDP-Glucuronyltransferase unter Phenobarbital (auf ca. 320 o/o) und der 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase durch Benzpyren (auf 180 o/o) ließ sich bestätigen. Trans-Stilben-oxid scheint ein besonders guter Induktor für die Morphin-UDP-Glucuronyltransferase zu sein (ca. 500 o/o).
DDT induziert alle Glucuronyltransferasen etwa im gleichen Ausmaß. Polyoestradiolphosphat hemmt in hohen Dosen ausschließlich die 1-Naphthol-UDP-Glucuronyltransferase (signifikant !).

5.6 Schlußfolgerungen

Aus diesen Untersuchungen wird geschlossen, daß die Aktivitäten der UDP-Glucuronyltransferasen bei schweren akuten und chronischen Leberschäden nur geringfügig vermindert sind. Bei leichten - insbesondere reaktiven - Hepatitiden findet man wie auch bei der Fettleber einen geringen Aktivitätsanstieg. Die erhöhte Aktivität bei Patienten

mit Cholelithiasis läßt sich möglicherweise als Folge rezidivierender Cholangitiden mit Begleithepatitis erklären. Nach diesen Untersuchungen scheint Alkohol einen induzierenden Einfluß zu besitzen. Zigarettenrauch wirkt offensichtlich über seinen Anteil an polyzyklischen Kohlenwasserstoffen induzierend. Toxische Leberschäden unter Rifampicin und Polyoestradiophosphat lassen sich nicht durch einen verringerten Effekt der UDP-Glucuronyltransferasen erklären, das gilt auch für die Behandlung mit Antikonzeptiva. Die UDP-Glucuronyltransferasen scheinen auch bei den chemischen Kanzerogenen anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht der geschwindigkeitslimitierende Schritt bei der Detoxifikation kanzerogener Metabolite zu sein, da ihre Aktivität unter verschiedenen Noxen zunimmt bzw. nicht abnimmt.

6. Literaturverzeichnis

1. Abou-El-Makarem and K.W. Bock.:
UDP-glucuronyltransferase in perfused rat liver and in microsomes, glucuronidation of bilirubin
Eur J Pharmacol 62, pp 411-416 (1976)

2. Dachi, Y. and T. Yamamoto:
Influence of drugs and chemical upon hepatic enzymes and proteins. I. Structure-activity relationship between various barbiturates and microsomal enzyme induction in rat liver
Biochem Pharmacol 25, pp 663-668 (1976)

3. Aitio, A.:
Glucuronide synthesis in the rat and guinea pig lung
Xenobiotica 3, p 13 (1973)

4. Aitio, A.:
UDP-glucuronyltransferase activity in various rat tissue
Int J Biochem 5, p 325 (1974)

5. Aitio, A., M. Ahotupa and M.G. Parkki:
Effect of metal salts on UDP-glucuronyltransferase activity of various agycones in rat liver microsomes in vitro
Eur J Drug Metab Pharmacokinet 5(1), pp35 (1980)

6. Aitio, A. and M. G. Parrki:
Activation and inhibition of rat hepatic UDP-glucuronyltransferase by mercuric-acetate
Xenobiotica 11(2), pp 97-102 (1981)

7. Anand, B.S., A.P. Narang, J.B. Dilavan, A. Koshy and D.V. Datta:
Bilirubin-glucuronyltransferase activity in the human gastic and duodenal mucosa - a preliminary report
Indian J Med Res 71, pp 109-111 (1980)

8. Arion, W.J., B.K. Wallin, P.W. Carlson, A.J. Lange:
The specifity of glucose-6-phosphatase of intact liver microsomes
J Biol Chem 247, pp 2558-2565 (1972)

9. Auclair, C., J. Hakim, P. Boicin, H. Troube, J. Boucherot:
Bilirubin and p-nitrophenol glucuronyltransferase activities of the liver in patients with Gilbert's syndrome, an attempt at a biochemical break-down of the Gilbert's syndrome
Enzyme 21, pp 97-107 (1976)

10. Aud'Etat, V., R. Preisig und J. Bircher:
Der Aminopyrin-Atemtest unter akuter Alkoholeinwirkung zur Messung der microsomalen Funktion der Leber
Schweiz Med Wochenschr 107, pp 231-235 (1977)

11. Axelrod, J.:
The enzymatic deamination of amphetamine (benzedrine)
J Biol Chem 214, pp 753-763 (1957)

12. Axelrod, J., J.K. Inscoe and G.M. Tomkins:
Enzymatic synthesis of N-glucuronide and conjugates
J Biol Chem 232, pp 835-841 (1958)

13. Back, P.:
Isolation and identification of a chenodeoxycholic acid glucuronide from human plasma in the intrahepatic cholestasis
Hoppe-Syler's Z Physiol Chem 357, pp 213-217 (1976)

14. Back, P. and D. Bowen:
Bile acid glucuronides II
Chemical synthesis and characterization of glucuronic acid coupled mono-, di-m and trihydroxy bile acids
Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 357, pp 219-224 (1976)

15. Back, P., K. Spaczynski and W. Gerok:
Bile salt glucuronides in urine
Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 355, pp 749-752 (1974)

16. Bansal, B.S., J. Zaleski and T. Gessner:
Glucuronidation of 3-Hydroxybenzo(a)pyrene derivation by UDP-glucuronyltransferase of nuclear envelope
Biochem Biophys Res Commun 98(1), pp 131-139 (1981)

17. Baron, J. and T.R. Tephly:
Further studies on the relationship of stimulatory effect of phenobarbital and 3,4-benzpyrene on hepatic heme synthesis of their effect on hepatic micorsomal drug oxidations
Arch Biochem Biophys 139, pp 410-420 (1970)

18. Batt, A.M. P. MacKenzie, O. Haenninen and H. Vainio:
Glucuronidation of 3-hydroxybenzo(a)pyrene in liver microsomes
Med Biol 57(5), pp 281-286 (1979)

19. Becking, G.C.:
Vitamine A status and hepatic drug metabolism in the rat
Can J Physiol Pharmacol 51, pp 6-11 (1973)

20. Bü3ellü3et, H. and A. Raynaud:
An applied bilirubin UDP-glucuronyltransferase test on needle-biopsies of Gilbert's syndrome
Clin Chim Acta 53, pp 51-55 (1974)

21. van Berge Henegouwen, G.P., K.-H. Brandt, H. Eyssen and G. Parmentier:
Sulphated and unsulphated bile acids in serum, bile, and urine of patients with cholestasis
Gut 17, pp 861-869 (1976)

22. Berk, P.D. and N.B. Javitt:
Hyperbilirubinaemia and cholestasis
Am J Med 64, pp 311-326 (1978)

23. Berry, C. and T. Hallinan:
Summery of a novel, three component regulatory model for uridine diphosphate glucuronyltransferase
Biochim Biophys Acta 403, pp 335-344 (1975)

24. Berry, C., A. Stellom and T. Hallinan:
Guinea pig liver microsomal UDP-glucuronyl-transferase: compartimented or phospholipid-constrained?
Biochim Biophys Acta 403, pp 335-344 (1975)

25. Black, M. and B.H. Billing:
Hepatic bilirubin UDP-glucuronyltransferase activity in liver disease and Gilbert's syndrome
New Eng J Med 280, pp 1266-1271 (1969)

26. Black, M., B.H. Billing and K.P.M. Heirweigh:
Determination of bilirubin UDP-glucuronyl-transferase activitiy in needle-biopsy specimens of human liver
Clin Chim Acta 29, pp 27-35 (1970)

27. Black, M., R. Perret and A.E. Career:
Hepatic bilirubin glucuronyltransferase activity and cytochrom P450 content in a surgical population, and the effect of preoperative drug therapy
J Lab Clin Med 81, pp 704-712 (1973)

28. Black, M. and S. Sherlock:
Treatment of Gilbert's syndrome with phenobarbital
Lancet i, pp 1359-1362 (1970)

29. Bock, K.W.:
Konjugation von Bilirubin, enzymatischer Aspekt
Verh Dtsch Ges Inn Med, pp 468-472 (1976)

30. Bock, K.W., G. van Ackeren, F. Lorch and F.W. Birke:
Metabolism of naphthalene to naphthalene dihydrol glucuronide in isolated hepatocytes and in liver microsomes
Biochem Pharmacol 25, pp 2351-2356 (1976)

31. Bock, K.W., G. Brunner, H. Hoensch, E. Huber and D. Josting:
Determination of microsomal UDP-glucuronyl-transferase in needle-biopsy specimens of human liver
Eur J Clin Pharmacol 14, pp 367-373 (1978)

32. Bock, K.W, U.C. von Clausbruch, D. Josting and H. Ottenwälder:
Speration and partial purification of two differentially inducible UDP-glucuronyltransferases from rat liver
Biochem Pharmacol 22, pp 1557-1564 (1973)

33. Bock, K.W., U.C. von Clausbruch R. Kaufmann, W. Lilienblum, F. Oesch, H. Pfeil und K.L. Platt:
Functional heterogeneity of UDP-glucuronyl-transferase in rat tissue
Biochem Pharmacol 29(4), pp 495-500 (1980)

34 Bock, K.W., W. Fröhling und H. Remmer:
Influence of fasting and hemin on microsomal cytochromes and enzymes
Biochem Pharmacol 22, pp 1557-1564 (1973)

35. Bock, K.W., W. Fröhling, H. Remmer und B.U. Rexer:
Effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on substrate specifity of rat liver microsomal UDP-glucuronyltransferase
Biochim Biophys Actá 327, pp 46-56 (1973)

36. Bock, K.W., S.E. Huber und W. Schlote:
UDP-glucuronyltransferase in perfused rat liver and in microsomes, effects of CCl_4 injury
NS Arch Phyrmacol 296, pp 199-203 (1977)

37. Bock, K.W., D. Josting, W. Lilienblum und H. Pfeil:
Purification of rat-liver microsomal UDP-glucuronyltransferase. Seperation of two enzyme forms inducible by 3-methylcholanthrene or phenobarbital
Eur J Biochem 98, pp 19-26 (1979)

38. Bock. K.W. und W. Lilienblum:
Activation and induction of rat liver microsomal UDP-glucuronyltransferase with 6-hydroxybenzo(a)pyrene and N-hydroxy-2-naphthylamine as substrate
Biochem Pharmacol 28, pp 695-700 (1979)

39. Bock, K.W., F. Lorch und G. von Ackeren:
Proceedings: Substrate specifity of UDP-glucuronyltransferase in rat liver and in Morris hepatomas: studies on an connection with the monooxygenaseepoxide hydratase system
NS Arch Pharmacol 187, Suppl 1977, R 77

40. Bock, K.W., F. Lorch und G. van Ackeren:
Activation and induction of microsomal UDP-glucuronyltransferase in rat liver and in Morris hepatoma 7777, 51236, 9121
Joint Meeting 1974, Bd 355, pp 1177-1178

41. Bock, K.W., R. Kahl und W. Lilienblum:
Induction of art hepatic UDP-glucuronyltransferase by dietary ethoxyquin
NS Arch Pharmacol 310(3), pp 249-252 (1980)

42. Bock, K.W., U.C. von Clausbruch, R. Kaufmann, W. Lilienblum, F. Oesch, H. Pfeil und K.L. Platt
Funkctional heterogeneity of UDP-glucuronyltransferase in rat tissue
Biochem Pharmacol 29(4), pp 495-500 (1980)

43. Bock, K.W. und I.N.H. Wkite:
UDP-glucuronyltransferase in perfused rat liver and in microsomes: influence of phenobarbital and 3-methylcholanthrene
Europ J Biochem 46, pp 451-459

44. Bolt, H.M. und M. Bolt:
Die Wirkungsinferenz zwischen Rifampicin und oralen Antikonzeptiva
Internist 15, pp 571-572 (1974)

45. Bolt, H.M. H. Kappus und M. Bolt:
Effect of rifampicin- treatment on the metabolism of oestradiol and 17-alpha ethinyloestradiol by human liver microsomes
Europ J Clin Pharmacol 8, pp 301-307 (1975)

46. Bolt, H.M. and H. Remmer:
Impication of rifampicin-quinone in the irreversible binding of rifampicin to macromolecules
Xenobiotica 6, pp 21-23 (1976)

47. Brodie, B.B., J.R. Gilette and B.N. La Du:
Enzymatic metabolism of drugs and foreign compounds
Ann Rev Biochem 27, pp 427-454 (1958)

48. Brunner, G. and Ch.J. Holoway:
A new method for the assay of UDP-glucuronyltransferase: the capiallary isotachophoretic analysis of reactants and products of glucuronidation
Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 381, pp 1-7 (1980)

49. Brunner, G., C.J. Holoway and H. Loesgen:
Large agarose beads for extracorporal detoxifaction systems. Preparation and enzymatic properties of agarose-bound UDP-glucuronyltransferase
Int J Artif Organs 2, pp 163-169 (1979)

50. Burchell, B., P. Bentley and F. Oesch:
Latency of epoxide hydratase and its relationship to that of UDP-glucuronyltransferase
Biochim Biophys Acta 444, pp 531538 (1976)

51. Burchell, B., G.J. Dutton and A.M.Newetu:
Development of phenobarbital-sensitive controll mechanisms for UDP-glucuronyltransferase relation to protein and ribonucleic acid synthesis
J Cell Biol 55, pp 448 (1972)

52. Canalese, J., J. Cauldwell, E.N. Wardle, and H.F. Woods:
Glucuronyltransferase activity in uraemic rats
J Pharm Pharmacol 32, pp 32 (1980)

53. Capel, I.D., M. Jenner, H.M. Dorrell and D.C. Williams:
The effect of chloroform inhalation on hepatic glucuronidation and de-glucuronidation mechanisms
Drug Chem Toxicol 3(1), pp 73-81 (1980)

54. Cukier, J.O., P.F. Whitington, G.B. Odell:
Bilirubin UDP-glucuronyltransferase of liver in postmature rats. A functional and morphologic comparison
Lab Invest 44(4), pp 368-374 (1981)

55. Cummings, J., A.B. Graham and G.C. Wood:
The phopholipid dependence of UDP glucuronyltransferase Temperature-dependence of microsomal enzyme activity
Biochem J 185 (2), pp 521-526 (1980)

56. Czygan, P., A. Stiehl and M. Senn:
The synthesis of bile acid glucuronides by agarose bound UDP-glucuronyltransferase

Biochim Biophys Acta 619 (2), pp 228-235 (1980)

57. Datta, D.V., R. Nair and C.R. Nair: Estimation of hepatic bilirubin UDP-glucuronyltransferase in patients with non-cirrhotic portal fibrosis and liver diseases: significance and limitations Am J Dis 20, pp 961-967 (1975)

58. Davies, M., R. Williams and D.M. Burlex: Rifampicine and enzyme induction Med Chir Dig 5, pp 341-343 (1976)

59. Dingwell, J.V. and N. Sossi: Studies of the mechanism of substrate activation of glucuronyltransferase by 7-hydroxychlorpromazine Drug Metab Dispos 7, pp 61-64 (1979)

60. Dew, R. and B.G. Preistly: Microsomal drug metabolism during alpha-Naphthyl-isothiocyanate-induced cholestasis Toxil Appl Pharmacol 35, pp 491-499 (1976)

61. Dioguardi, N.: in: Intrahepatic cholestasis Ed: Gentilini, P., Raven Press, New York 1975

62. Dutton, G.J.: Foetal and gastrointestinal glucuronides synthesis Biochem J 69, p 39P (1958)

63. Dutton, G.J.:
Uridine diphospho glucuronic acid as glucuronyl donor in the synthesis of 'ester' aliphatic and steroid glucuronides
Biochem J 64, pp 693-701 (1956)

64. Elmamlouk, T.H. and H. Mukhtar:
Trans-Stilbene-Oxide: A new inducer of rat liver microsomal UDP-glucuronyltransferase
Biochem Pharmacol 28, pp 539-542

65. Elvin, A.T., D. Lalka, K. Stoeckel, P. du Souich, J.E. Axelson, L.H. Golden and A.J. McLean:
Tocainide kinetics and metabolism: effects of phenobarbital and substrates of glucuronyltransferase
Clin Pharmacol Ther 28(5), pp 652-658 (1980)

66. Felsher, B.F., N.W. Craig and N. Carpio:
Hepatic bilirubin glucuronidation in Gilbert's syndrome
J Lab Clin Med 81, pp 829-837 (1973)

67. Felsher, B.F., N.W. Carpio, M.W. Woolley and M.J. Asch:
Hepatic bilirubin glucuronidation in neonates with unconjugated hyperbilirubinaemia and congenital gastrointestinal obstructions
J Lab Clin Med 83, pp 90-96 (1974)

68. Felsher, B.F., D. Rickard and A. Redeker:
The reciprocal relation between caloric intake and the degree of hyperbilirubinaemia in Gilbert's syndrome
New Engl J Med 283, pp 170-172 (1970)

69. Fevery, J., N. Blanckaert, K.P. Heirweigh and J. Groote:
Bilirubin conjugates: formation and detection
Prog Liver Dis 5, pp 183-214 (1976)

70. Fleischmann, R., H. Mattenheimer, A.W. Holmes and H. Remmer:
Micromethod for the preparation of a microsomal fraction from rat and human liver by differential sedimentation
Biochem Biophys Res Com 62, pp 289-295 (1975)

71. Foliot, A., B. Christoforov, J.P. Petite, J.P. Etienne, E. Housset and M. Dubois:
Bilirubin UDP-glucuronyltransferase activity of Wistar rat kidney
Am J Physiol 229, pp 340-343 (1975)

72. Foliot, A., J.L. Droucourt, J.P. Etienne, E. Housset, J.N. Fiessinger and B. Christiforov:
Increase in the hepatic bilirubin glucuronidation and the clearance of bilirubin in clofibratetreated rats
Biochem Pharmacol 26, pp 547-549 (1977)

73. Freston, J.W., J.W. Work and E. Denti:
Bilirubin removal by hemoperfusion through carbon and by in vivo immobilized enzymes
Kidney Int (Suppl) 7, pp S 229-232 (1976)

74. Fröhling, W and A. Stiehl:
Bile salt glucuronides: identification and quantitative analysis in the urine of patients with cholestasis
Europ J Invest 1976, pp 67-74

75. Fröhling, W., A. Stiehl, E. Ast, P. Czygan und B. Kommerell:
Induction und Aktivierung der Gallensäure-Glucuronyltransferase in Rattenlebermicrosomen
Verhand Dtsch Ges Inn Med 82 PT 1, pp 351-354 (1976)

76. Fröhling, W., A. Stiehl, P. Czygan and B. Kommerell:
Induction and activation of rat liver microsomal bile salt glucuronyltransferase
Biochem Biophys Acta 444, pp 525-530 (1976)

77. Gessner, T.:
A Comparison of steroid glucuronyltransferase of rat liver and hepatoma, and effects of phenobarbitone and 3-methylcholanthrene induction
Biochem Soc Trans 4, pp 522-524 (1976)

78. Gigon, P.L. and M.H. Bickel:
Interference of UDP-glucuronyltransferase and betaglucuronidase activity in rat liver microsomes at pH 7.5 with p-nitrophenol and p-nitrophenolglucuronide as substrates
Enzyme 24 (4), pp 230-238 (1979)

79. Gessner, T.:
Occurence of steroid glucuronyltransferase in hepatoma
Cancer Res 37, pp 2275-2281 (1977)

80. Glatt, H.R., R. Billings, K.L. Platt and F. Oesch:
Improvement of correlation of bacterial mutagenecity with carcinogenicity of benzo-(a)pyrene and four of its major metabolites by activation with intact liver cells instead of call homogenate
Cancer Res 41, pp 270-270 (1981)

81. Gregory, D.H. and R.D. Strickland:
Solubilization and characterization of hepatic bilirubin UDP-glucuronyltransferase
Biochem Biophys Acta 27, pp 36-45 (1973)

82. Grodsky, G.M. and J.V. Carbone
Synthesis of bilirubin glucuronides by tissue homogenates
J Biol Chem 226, pp 449 (1957)

83. Grattinin, S., E. Mussini, F. Marcucci and A. Guaitani:
the benzodiazepines
Raven Press, New York, pp 76-97 (1973)

84. Hänninen, O., M. Lang, U. Koivusaari and T. Ollikainen:
UDP-glucuronyltransferase: substrate specifity and reactivation after partial seperation from other membrane components

Biol Reac Intermediates, Ed: Jallow, Kocsis, Snyder, Vainio, Plenum Press 1977

85. Hartiala, K., P. Leikkola and P. Savola: Further studies on the intestinal glucuronide synthesis
Acta Physiol Scand 442, pp 36-40 (1958)

86. Heimsch, E. und T. Dobler: Ein Qualitätskontrollsystem für Biotransformationsenzyme in der Dünndarmmucosa
J Clin Chem Clin Biochem 18(11), pp 775-780 (1980)

87. Hietanen, E., M. Lattinen, H. Vainio and O. Hänninen: Dietary fats and porperties of endoplasmic reticulm: II. Dietary lipid induced changes in the activation of drug metabolizing enzymes in liver and duodenum of rats
Lipids 10, pp 467-472 (1975)

88. Hofmann, A.F. and G. Paumgartner: Chenodeoxycholic acid therapy for gall stones 1975 Schattauer, Stuttgart

89. Hollmann, F. and D.P. Touster: Alteration in tissue levels of uridine glucose dehydrogenase, uridine diphosphate glucuronic acid phyrophosphatase, and glucuronyltransferase induced by substances influencing the production of ascorbic acid
Biochem Biophys Acta 26, pp 338-353 (1962)

90. Iser, J.H., R.H. Dowling, H.Y.I. Mok and G. D. Bell:
Chenodexycholic acid treatment of gallstones
New Engl J Med 293, pp 378-383 (1975)

91. Isselbacher, K.J., M.F. Chrabas and R.C. Quinn:
the solubilization and partial purification of a glucuronyltransferase fromm rat liver microsomes
J Biol Chem 237, pp 3033 (1962)

92. Jansen, P.L. and I.M. Arias:
Delipidation and reactivation of UDP glucuronyltransferase from rat liver
Biochem Biophys Acta 391, pp 23-38 (1975)

93. Katona, E.:
The influence of short ehter anaestesia on some liver enzyme activities in the rat
Can J Phys Pharmacol 51, pp 604-607 (1972)

94. Kratz, F.:
Coumarin-7-hydroxylase activity in microsomes from needle biopsies of normal and diseased human liver
Europ J Clin Pharmacol 10, pp 133-137 (1976)

95. Hers: Kühn, H.A. und H. Wernze:
Klinische Hepatologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1979

96. La Du, B.N., L. Gaudette, N. Trousof and B. B.Brodie:
Enzymatic dealkylation of aminopyrene (pyramidon) and other alkylamines
J Biol Chem 214, pp 741-745 (1955)

97. Lagarriga, J. and I.A. Bouchier:
The effect of phenobarbital on cholesterol gall stones in hamster
Gut 14, pp 956-961 (1973)

98. Lage, B.G., R.C. Longland, R.A. Hodgson, B. J. Severn and S.D. Gangoli:
The effect of some foreign compounds on hepatic xenobiotic metabolism and on urinars excretion of D-glucuronic acid metabolites in the rat
Biochem Soc Trans 5, pp 308-309 (1977)

99. Lamartiniere, C.A., C.S. Dieringer, E. Kita and G.W. Lucier:
Altered sexual differentiation of hepatic UDP-glucuronyltransferase by neonatal hormone treatment in rats
Biochem J 180 (2), pp 313-318 (1979)

100. Lang, M., M. Lattinen, E. Hietanen and H. Vainio:
Midification of microsomal membranes components and induction of hepatic drug biotransformation in rats on high cholesterol diet
Acta Pharmacol Toxicol 39, pp 273-288 (1976)

101. Leber, H.W., L. Gleumes and G. Schütterle:
Enzyme induction in the uraemic rat liver
Kidney (Suppl) 8, pp 43-48 (1978)

102. Leber, H.W., A. Gleumes und G. Schütterle:
Untersuchungen zum Einfluß der Urämie auf die Glucuronidierung von Arzneimitteln in Rattenlebermicrosomen
Verh Dtsch Ges Inn Med 79, pp 711-713 (1973)

103. Linhardt, P.:
Affinity of UDP-glucuronyltransferase for several substrates and for chloramphenicol
Res Exp Med 163, pp 241-249 (1974)

104. Litt, I.P., M.I. Cohen and H. McNamara:
Isoniazid hepatitis in adolescents
J Peiatr 89, pp 133-135 (1976)

105. Litterst, C.L., T.E. Gram, E.G. Mimnaugh, P. Leber, D. Emmerling and R.I. Freudenthal:
A comprehensive study of in vitro drug metabolism in several laboratiry species
Drug Metab Dispos 4, pp 203-207 (1976)

106. Litterst, C.L., E.G. Mimnaugh and T.E. Gram:
Effect of strain differences and tumor presence on microsomal drug metabolism in the guinea pig: brief communication
J Natl Cancer Inst 59, pp 1737-1739 (1977)

107. Litterst, C.L., E.G. Mimnaugh, R.L. Reagan and T.E. Gram:
Comparison of in-vitro metabolism by lung, liver, and kindney of several common laboratory species
Drug Metab Dispos 3, pp 259-265 (1976)

108. Lucier, G.W., O.S. Mc Daniel, H.B. Matthews:
Microsomal rat liver UDP-glucuronyltransferase: Effects of piperonyl butoxide and other factors on enzyme activity
Arch Biochem Biophys 145, pp 520-530 (1971)

109. Lueders, K.K., H.M. Dyer, E.B. Thompson and E.L. Kuff:
Glucuronyltransferase activity in transplantable rat hepatomas
Cancer Res, pp 274-279 (1970)

110. Lueders, K.K. and E.L. Kuff
Spontaneous and detergent activation of a glucuronyltransferase in vitro
Arch Biochem Biophys 120, pp 198-203 (1967)

111. Maddrey, W.C., J.C. Cukier, A.C. Maglalang, J.K. Boinott and G.B. Odell:
Hepatic bilirubin-UDP-glucuronyltransferase in patients with sickle cell anaemie
Gastroenterology 74, pp 193-195 (1978)

112. Magdalou, J., M. Balland, C. Thirion and G. Siest:
Effects of membrane-perturbants on UDP glucuronyltransferase activity in rat liver microsomes. Circular dichroism studies
Chem Biol Interact 27, pp 255-268 (1979)

113. Mahu, J.L., A.M. Preaux, P. Mavier and P. Berthelot:
Characteriziation of microsomal bilirubin and p-nitrophenol UDP-glucuronyltransferase activities in human liver: a comparison with rat liver
Enzyme 26 (2), pp 93-102 (1981)

114. Makino, I., K. Shinozaki, K. Yoshino and S. Nakagawa:
Dissolution of cholesterol gallstones by ursodeoxycholic acid
Jap J Gastroent 72, pp 690-702 (1975)

115. Mallet, L., A. Foliot, J.P. Amat, E. Housset et J.P. Camillieri:
Cytochrome P 450 et bilirubin glucuronosyl transferase hepatiques dans la cirrhose du rat au tetrachlorure de carbone: d'emonstration d'une induction enzymatique par le clofibrate
Gastroenterol Clin Biol 4, pp 425-431 (1980)

116. Marniemi, J., A. Aitio and H. Vainio:
Ethanol induced alteration of microsomal membrane bound enzyme of rat liver in vitro
Acta Pharmacol Toxicol 37, pp 222-232 (1975)

117. Matern, H., S. Matern. C. Schelzig and W. Gerok:
Bile acid UDP-glucuronyltransferase from human liver. Properties and studies and aglycone substrate specifity
FEBS lett 118 (2), pp 251-254 (1980)

118. Maxwell, J.D., J. Hunter, D.A. Stewart, M. Carrella and R. Williams:
Effect of phenobarbitone on bile flow and bilirubin metabolism in man and rat
Digestion 9, pp 138-148 (1973)

119. Menken, M., P.V.D. Barett and N.I. Berlin:
Assay of hepatic glucuronyltransferase activity using (^{14}C) bilirubin as substrate
Clin Chim Acta 14, pp 777-785 (1966)

120. Miettinen, T.A. and E. Leskinen:
Enzyme levels of glucuronic acid metabolism in the liver, kidney, and intestine on normal and fasted rats
Biochem Pharmacol 12, pp 565-576 (1963)

121. Miguet, J.P., P. Mavier, C.J. Soussy and D. Dhumeaux:
Induction of hepatic microsomal enzymes after brief administration of rifampicin in man
Gastroenetrology 72, pp 924-926 (1977)

122. Mowat, A.P. and I.M. Arias:
Partial purification of hepatic UDP-glucuronyltransferase studies of some of its properties
Biochim Biophys Acta 212, pp 65-78 (1970)

123. Mulder, G.J.:
Bilirubin and the heterogeneity of microsomal uridine diphosphate glucuronyltransferase from rat liver
Biochem Biophys Acta 289, pp 284-292 (1972)

124 Mulder, G.J.:
On non specific inhibition of rat liver microsomal UDP glucuronyltransferase by some drugs
Biochem Pharmacol 23, pp 1283-1291 (1974)

125. Mulder, G.J.:
The effect of phenobarbital an the submicrosomal distribution of uridine diphosphate glucuronyltransferase from rat liver
Biochem J 117, pp 319-324 (1970)

126. Mulder, G.J.:
The heterogeneity of UDP-glucuronyltransferase from rat liver
Biochem J 125, -p 9-15 (1972)

127. Mulder, G.J. and I. van Doorn:
A rapid NAD^+-linked assay for microsomal uridine diphosphate glucuronyltransferase of rat liver and some observations on substrate specifity of the enzyme
Biochem J 151, pp 131-140 (1975)

128. Mulder, G.J. and E. Scholtens:
Phenol sulphotransferase and UDP-glucuronyl-transferase from rat liver in vivo and in vitro, 2,6-dichloro-4-nitrophenol as selective inhibitor of sulphation
Biochem J 165, pp 553-559 (1977)

129. Mumford, J.P.:
Letter: drugs effecting oral contraceptives
Br Med J 2, pp 333-334 (1974)

130. Nakata, D, D. Zakim and D.A. Vessey:
Defective function of a microsomal UDP-glucuronyltransferase in Gunn rats
Proc Natl Acad Sci USA 73, pp 289-292 (1976)

131. Nitti, V., A. Ninni, G. Meola, A. Iuliano and G. Curci:
Comparative investigations of the enzyme-inducing activity of rifampicin and barbi-turates in man
Chemotherapy 19, pp 206-210 (1973)

132. Okolicsanyin, L., J. Frei, P. Magnenat and R. Naccarato:
Specifity of UDP-glucuronyltransferase (III)
Enzyme 12, pp 658-673 (1971)

133. Onishi, S., N. Kawade, S. Itoh, K. Isobe and S. Sugiyama:
Postnatal development of uridine diphosphate glucuronyltransferase activity towards bilirubin and 2-aminophenol in human liver
Biochem J 184, pp 705-707 (1979)

134. Orme, M.L.E., L. Davies and A. Breckenridge:
Increased glucuronidation of bilirubin in man and rat by administration of antipyrene (phenazone)
Clin Sc Mol Med 46, pp 511-518 (1974)

135. Otani, G., M.M. Abou-el-Makarem and K.W. Bock:
UDP-glucuronyltransferase in perfused rat liver and in microsomes. III Effects of galactosamine and carbon tetrachloride on the glucuronidation of 1-naphthol and bilirubi-
Biochem Pharmacol 25, pp 1293-1297 (1976)

136. Perona, G., R. Corrocher, M. Frezza, G.C. Cellerino and C. Tiribelli:
Phenobarbitone-jaundice of haemolytic patients
Br J Haematology 25, pp 723-736 (1973)

137. Pessayre, D., M. Bentata, C. Degott, J.P. Miguet, B. Rueff and J.P. Benhamou:
Isoniazid-rifampicin fulminant hepatitis: a possible consequence of the enhancement of isoniazid hepatotoxicity by enzyme induction
Gastroenterology 72, pp 284-289 (1977)

138. Pessayre, D. and P. Mazel:
Induction and inhibition of hepatic drug metabolizing enzymes by rifampicin
Biochem Pharmacol 25, pp 943-949 (1976)

139. Piguet, B., J.F. Muglioni and G. Chaline:
Contraception orale et rifampicine
Nouv Presse Med 4, pp 115-116 (1975)

140. Puhakainen, E. and O. Hänninen:
Pyrophosphatase and glucuronyltransferase in microsomal UDP glucuronic acid metabolism in the rat liver
Eur J Biochem 61, pp 165-169 (1976)

141. Puuka, P., M. Laitinen, H. Vainio and O. Hänninen:
Hepatic UDP glucuronyltransferase. Partial purification after 3-methylcholanthrene pretreatment of the rat
Int J Biochem 6, pp 276-280 (1975)

142. Rao, G.S., M.I. Rao, G. Haneter and H. Breuer:
Steroid glucuronyltransferase: V Formation and hydrolysis of oestrogen glucuronides by the liver, kidney, and intestine of the pig
Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 355, pp 881-890 (1973)

143. Remmer, H.:
Induction of drug metabolizing enzyme system in the liver
Europ J Clin Pharmacol 5, pp 116-136 (1972)

144. Remmer, H., B. Schöne and R.A. Fleischmann:
Induction of the unspecific microsomal hydroxylase in the human liver
Drug Metab Dipos 1, pp 224-229 (1973)

145. Rexer, B.U.:
Diplomarbeit am Institut für Physiologische Chemie und Biochemie, 1976

146. Ricci, G.L. and J. Fevery:
Stimulation by secretin of bilirubin UDP-glucuronyltransferase activities and of cytochrome P 450 concentration in rat liver
Biochem J 182, pp 881-884 (1979)

147. va. Roy, I. and K.P. Heirweigh:
Determination of bilirubin glucuronide and assay of glucuronyltransferase with bilirubin as acceptor
Biochem J 107 , pp 507-518 (1968)

148. Rugstad, H.E. and E. Dybing:
Competition between p-aminophenol, p-nitrophenol, and bilirubin for glucuronidation in the cultures of rat hepatomas cells and homogenates of the same cells
Acta Pharmacol Toxicol 34, pp 65-75 (1974)

149. Sachan, D.S.:
Effects of low and high protein diet on the induction of microsomal drug-metabolizing enzymes in rat liver
J Nutr 105, pp 1631-1639 (1975)

150. Saland, J., H. McNamara and M.I. Cohen:
Navajo Jaundice: a variant of neonatal hyperbilirubinaemia associated with breast feeding
J Ped 85, pp 271-275 (1974)

151. Sanchez, E., L. Tampier and J. Mardones:
Receptors for morphine and opioids
Gen Pharmacol 7, pp 107-110 (1976)

152. Sanchez, E. and T.R. Tephly:
Activation of hepatic microsomal glucuronyl-transferase by bilirubin
Life Sci 13, pp 1483-1490 (1973)

153. Sanchez, E. and T.R. Tephley:
I. Evendence for seperate enzymes in the glucuronidation of morphine and p-nitrophenol by rat hepatic microsomes
Drug Metab Disp 2, pp 247-253 (1974)

154. Sanchez, E. and T.R. Tephly:
Morphine metabolism. IV Studies on the mechanism of morphin-uridine diphosphoglucuronyltransferase and its activation by bilirubin
Mol Pharmacol 11, pp 613-620 (1975)

155. Sanchez, E., E. Del Villar and T.R. Tephly:
Structural requirements in the reaction of morphine UDPGA transferase with opioid structures
Biochem J 169, pp 173-177 (1978)

156. Schöllhammer, I., D.S. Pooo and M.H. Bickel:
Liver microsomal ß-glucuronidase and UDP-glucuronyltransferase
Enzyme 20, pp 269-276 (1975)

157. Sherlock, S. and D. Owens:
Diagnosis of Gilbert's Syndrome: role of reduced caloric uptake tast
Br Med J 3, pp 559-563 (1973)

158. Siddik, Z.H., B.I. Sikic, R. Drews, E.G. Mimnaugh, C.L. Litterst and T.E. Gram:
Lack of correlation between cortisol-induced precocious maturation of fetal rabbit lung and drug metabolism
Biochem Pharmacol 28, pp 683-685 (1979)

159. Soergel, F., F.E. Beyhl and E. Mutschler:
Inhibition of UDP glucuronyltransferase caused by furosemide
Experientia 36, pp 861-863 (1980)

160. Solymoss, B. and G. Zsigmond:
Effect of micirosomal enzyme inducers on the liver changes produced by common bile-duct ligature
Proc Soc Exp Biol Med 147, pp 430-433 (1974)

161. Solymoss, B. and G. Zsigmond:
Effect of various steroids on the hepatic glucuronidation and biliary excretion of bilirubin
Can J. Physiol Pharmacol 51, pp 319-323 (1972)

162. Stiehl, A. P. Czygan und B. Kommerell:
Gallensäureglukuronide in der Galle von Patienten mit Cholestase vor und nach Phenobarbitalbehandlung
FALK-Symposium Gallensäuren 1977, pp 55-58

163. Stramentinoli, G., A. Gazzaniga and D. Della Bella:
Increases of chloramphenical glucuronidation in rats treated with phenobarbital
Biochem Pharmacol 23, pp 1181-1186 (1974)

164. Schmid, R.:
In: Metabolic basis of inherited disease
Ed: Stabury, J.B., J. B. Wyngaard, D.S. Fredrickson
MacGraw-Hill Book Co., New York, pp 871-901, 1972

165. Stevenso, I., D. Greenwood and J. McEwen:
Hepatic UDP-glucuronyltransferase in Wistar and Gunn rats, in citro activation by Di-EthylNitrosamine
Biochem Biophys Res Com 32, pp 866-872 (1968)

166. Strebel, L. and G.B. Odell:
Bilirubin uridine diphospho-glucuronyltransferase in rat liver microsomes: genetic variation and maturation
Ped Res 5, pp 548-559 (1971)

167. Temple, A.R., A.K. Done and M.S. Clements:
Studies of glucuronidation III The measurement of p-nitrophénol-glucuronide
J Lab Cli Med 77, pp 1015-1019 (1971)

168. Thistla, J.L. and A.F. Hofmann:
Efficacy and specificity of chenodeoxycholic acid therapy for dissolving gallstones
New Engl J Med 289, pp 655-659 (1973)

169. Thompson, R.P.H., A.L.E.F. Eddleston and R. Williams:
Low plasma-bilirubin in epileptics on phenobarbitone
Lancet i, pp 21-22 (1969)

170. Vaisrub, S.:
Editorial: new test for Gilbert's syndrome
JAMA 227, S. 552 (1974)

171. Del Villar, E., E. Sanchez, A.P. Autor, T.R. Tephly:
III. Solubilization and separation of morphine and p-nitrophenol uridine di-phospho glucuronyl-transferase
Mol Pharmacol 11 (1975)

172. Del Villar, E., E. Sanchez and T.R. Tephly:
Morphine metabolism. V. Isolation of separate glucuronyltransferase activities for morphine and p-nitrophenol from rabbit liver microsomes
Drug Metab Dipos 5, pp 273-278 (1977)

173. Vessey, D.A., J. Goldenberg and D. Zakim:
Differentiation of homologous forms of hepatic microsomal UDP-glucuronyltransferase. II Characterization of bilirubin conjugating form
Biochim Biophys Acta 309, pp 75-82 (1973)

174. Vessey, D.A., J. Goldenberg and D. Zakim:
Kinetic properties of microsomal UDP-glucuronyltransferase evidence for cooperative kinetics and activation by UDP-N-acetylglucosamine
Biochim Biophys Acta 309, pp 58-66 (1973)

175. Vessey, D.A. and D. Zakim:
II Activation of hepatic uridine diphosphate-glucuronyltransferase
J Biol Chem 246, pp 4649-4656

176. Vessey, D.A. and D. Zakim:
Regulation of microsomal enzymes by phospholipids V. Kinetic studies of hepatic UDP glucuronyltransferase
J Biol Chem 247, pp 3023-3028 (1972)

177. Vessey, D.A. and D. Zakim:
Regulation of microsomal enzymes by phopholipids IV. Species differences in the properties of microsomal UDP glucuronyltransferase
Biochim Biophys Acta 268, pp 61-69 (1972)

178. Vessmann, J. and B. Alexanderson:
The Benzodiazepines
Raven Press, New York, pp 165-173 (1973)

179. Vore, M. and E. Soliven:
Hepatic estrone and estradiol glucuronyltransferase activity in pregnancy. Induction by pretreatment with 3-methylcholanthrene and phenobarbital
Drug Metab Dispos 7, pp 247-251 (1979)

180. Waltman, R., F. Bonora, G. Nigrin and C. Pipat:
Ethanol in prevention of hyperbilirubinaemia in the newborn
Lancet ii, pp 1265-1267 (1969)

181. Wetherhill, P.J., and B. Burchell:
The separation and purification of rat liver UDP-glucuronyltransferase activity towards testosterone and oestrone
Biochem J 189, pp 377-380 (1980)

182. Wehninger, H.:
Kongenitale nicht hämolytische Hyperbilirubinämien
Med Klin 72, pp 1463-1472 (1977)

183. Willson, A. and F.E. Hart:
Effect of experimental hepatic injury on in vitro drug metabolizing enzyme activities in the rat
Gastroenterology 73, pp 691-696 (1977)

184. Wisnes, A. and D. Bratlid:
Effects of bilirubin loading of pregnant rats on hepatic UDP-glucuronyltransferase activity in the off-spring
Biol Neonate 22, pp 367-373 (1973)

185. Wishart, G.J.:
Demonstration of functional heterogeneity of hepatic uridine diphosphate glucuronyltransferase activities after adminstration of 3-methylcholanthrene and phenobarbital in rats
Biochem J 174, pp 671-672 (1978)

186. Wishart, G.J.:
Functional heterogeneity of UDP-glucuronyltransferase as indicated by its differential development and inducibility by glucucorticoids, demonstration of two groups within the enzyme's activity towards twelve substrates
Biochem J 174, pp 485-489 (1978)

187. Wishart, G.J. and D.J. Fry:
Evidence from rat liver nuclear preparations that latency of microsomal UDP glucuronyltransferase is associated with vesiculation
Biochem J 186, pp 687-691 (1980)

188. Yeary, R.A., K.J. Wise and D.R. Davis:
Effects of bilirubin on glucuronidation of p-nitrophenol and morphine
Res Commun Chem Pathol Pharmacol 16, pp 463-474 (1977)

189. Zakim D.:
Regulation of microsomal enzymes by phospholipids I. Effects of phospholipase and Phospholipids on glucose-6-phophatase
J Biol Chem 245, pp 4953-4961 (1970)

190. Zakim, D., J. Goldenberg and D.A. Vessey:
Differentiation of homologous forms of hepatic microsomal UDP glucuronyltransferase I. Evidence for the glucuronidation of o-aminophenol and p-nitrohphenol by separate enzymes

191. Zakim, D., G.J. Goldenberg and D.A. Vessey:
Influence of membrane lipids on the regulatory properties of UDP-glucuronyltransferase
Europ J Biochem 38, pp 59-63 (1973)

192. Zakim, D. and D.A. Vessey:
Membrane bound estrone as substrate for microsomal UDP-glucuronyltransferase
J Biol Chem 252, pp 7534-7537 (1977)

193. Zakim, D. and D.A. Vessey:
Mambrane despendence of uridine diphospho glucuronyltransferase. Effects of membrane on kinetic properties
Biochem Soc Trans 2, p 1165 (1974)

194. Zakim, D. and D.A. Vessey:
IX. Production of uniquely modified forms of microsomal UDPGA-transferase by traetment with phopholipase A and detergent
Biochi, Biophys Acta 410, pp 61-73 (1975)

195. Zakim, D. and D.A. Vessey:
Resulation of microsomal enzymes by phospholipids III. The role on Sh-groups in the regulation of microsomal UDP-glucuronyltransferase
Arch Biochem Biophys 148, pp 97-106 (1972)

196. Ziebarth-Schrot, A.:
Zur Lebertoxizität der Rifamycine bei der Behandlung tuberkulöser Meningitiden
Wien Klin Wochenschr 85, pp 692-695 (1973)

197. Yeh, S.H. and L.A. Woods:
Determination of radioactive-labeled Codeine, Morphine, Diaydromorphine, and other metabolites in biological materials
J Pharm Scien 59, pp 380-383 (1970)

198. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall:
Protein measurement with Folin phenol reagent
J Biol Chem 193, pp 263-270 (1951)

199. Domschke, W. and S. Domschke:
Bilirubin Metabolism and bile secretion: hormonal influences
pp 167-176
in: hrs.: Bianchi, L., W. Gerok and K. Sickinger
Falk Symposium 23 - Liver and Bile
MTP Press, Lancaster 1977

200. Maton, P.N. and R.H. Dowling:
Hepatic cholestrol synthesis in cholelithiasis:
Role of HMGCoA-Reductase in response to and resistance to Medical therapy
pp 91-98
in: hrs.: Paumgartner, G., A. Stiehl and W. Gerok:
Falk Symposium 26 - Biological Effects of Bile acids
MTP Press, Lancaster 1979

Ich danke Herrn Privatdozent Dr. med. habil. R. Fleischmann für die Überlassung des Themas und für seine wertvolle Anleitung und Führung.

Ich danke meinen Eltern, die mir das Studium der Medizin ermöglicht haben.

Ich danke meinem akademischen Lehrer, Herrn Prof. Dr. med. Michael Arnold, für seine unschätzbaren geistigen Anregungen.

L E B E N S L A U F

Am 26. Februar 1956 wurde ich, Uwe Dieter Stärz, als Schn des Erich J. Stärz und der Irene Stärz, geborene Wimmel, in Nordhorn/Niedersachsen geboren.

Ich besuchte Grundschulen in Fulda/Hessen und in Ebersbach/Baden-Württemberg. Meine gymnasiale Ausbildung erhielt ich am Hohenstaufen-Gymnasium in Göppingen/Baden-Württemberg und am Theodor-Heuss-Gymnasium in Schopfheim/Baden-Württemberg, an dem ich am 23. Mai 1975 die Reifeprüfung ablegte.

An der Eberhard-Karls-Universität Tübingen bin ich seit dem Wintersemester 1975/76 für den Studiengang Humanmedizin und seit dem Sommersemester 1977 für das Studienfach Biochemie immatrikuliert.

Am 3. Mai 1982 habe ich das Staatsexamen in Human-Medizin (3. Ärztliche Prüfung) in Reutlingen/Baden-Württemberg bestanden.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45